核酸的化学

〔澳大利亚〕D. O. 佐登 著　施嘉鍾 等 譯

上海科学技术出版社



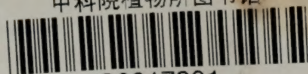
核酸的化学

〔澳大利亚〕D. O. 佐登 著

施嘉鍾 郑景略 汪堃經 潘筱平 陶鴻根 譯

施嘉鍾 李 亮 审閱

上海科学技术出版社



內容提要

本书介紹有关核酸的各种提取方法、結构和性质。叙述嘌呤碱和嘧啶碱、核苷和核苷酸的酸碱性、結构及其合成。尤其在核酸的結构和复制机制方面，以物理化学观点作了研究和討論，使讀者对核酸在生物学过程中所产生的独特作用有一較清楚的概念。

本书可供化学、生物化学、生物学、医学、农学工作者以及有关高等院校师生的参考。

THE CHEMISTRY OF NUCLEIC ACIDS
D. O. Jordan
Butterworths, 1960

核酸的化学

施嘉鍾　郑景略　汪酉經　潘筱平　陶鴻根　譯
施嘉鍾　李　亮　审閱

上海科学技术出版社出版（上海瑞金二路 450 号）
上海市书刊出版业营业許可証出 093 号

大东集成联合印刷厂印刷　新华书店上海发行所发行

开本 850×1156 1/32　印張 11 4/32　排版字数 294,000
1965 年 1 月第 1 版　1965 年 1 月第 1 次印刷
印数 1—3,700

統一书号 13119·621　定价（科六）1.70 元

序

目前关于核酸結构及其功能的知識是从累积多种不同学科的研究而来，其中涉及从物理到化学以及从生物化学到生物学和遺傳学的研究。一个包括核酸結构及功能的各方面的广泛著述将需要几卷的篇幅加以記載，而且亦在任何著者能力范圍以外。因此，我在这本书中只集中討論核酸的化学及其結构。这里所用的“結构”一詞包含最广泛的意义。因此除了叙述核酸分子的詳細构造，諸如分子內部原子的相对位置、鍵的本性以及核酸大分子的大小和形状外，还討論及由于不同核苷酸的排列次序，不同核苷酸的組成和不同核苷酸的分子大小所引起的核酸制备的不均一性。这样的叙述显然是需要的，因为如果象現在所相信的，核酸傳递遺傳密碼以及含有其他生物学的功能，則核酸的結构对于决定这些功能具有非常重要的意义。

D. O. 佐登

物理化学和无机化学部
Johnson 实驗室
Adelaide 大学
南澳大利亚

目　录

第一章　引　　言

化学、細胞学和遺傳学的綜合研究使人們相信核酸在控制生物的新陈代謝、生殖以及生长方面具有非常重要的意义。差不多所有新陈代謝的进行都要通过酶的作用，而这些酶的合成是受遺傳单位——基因所控制的。当細胞分裂时，基因必須可以复制，而且亦必須能对特殊的蛋白质分子的合成加以控制。在过去有一个时期，人們曾經认为与基因相結合的、作为細胞結构的染色体包含核酸和蛋白质。但近来具有可以信服的証据証明基因所具的重要遺傳部分只包含核酸，而不包含蛋白质。

核酸傳遞遺傳信息的概念来自 Avery、Macleod 和 McCarty[1] 的发現。这个发現指出首先由 Griffith[2] 所描述的‘遺傳轉移物质’就是高聚脫氧戊糖核酸[3]，这个物质在适当条件下能够誘致不包含在囊中的肺炎球菌 II 型的 R 变形体完全轉变为包含在囊中的肺炎球菌 III 型的 S 細胞。这种工作未曾立即得到应有的广泛承认，主要因为在当时关于核酸的結构仍趋向于錯誤的偏見，认为核酸是一个四核苷酸分子。但是，当洞察到核酸具有大分子的特征后，特别是 Hershey 和 Chase[4] 的工作指出噬菌体的本性与作用后，Avery 及其同工者的工作的重要性遂得到普遍的承认。Hershey 和 Chase[4] 能够証明当大腸噬菌体在适当的环境下加入到大腸杆菌細胞中时，組成噬菌体的核蛋白即开始解离，脫氧戊糖核酸和一小部分可溶性蛋白质遂进入細胞中，而大部分的蛋白质則遺留在細胞外面。在宿主細胞中后期所发生的噬菌体生殖过程中，特殊的蛋白质和脫氧戊糖核酸均曾合成，这些蛋白质和脫氧戊糖核酸与在未感染的宿主細胞中的任何組分均不相同。这种如一般所假定的种属特异物质是在特殊的遺傳决定因素影响下所产生的。在生成这种物质时，不是脫氧戊糖核酸就是可溶性蛋白

质进入細胞中，或且两者均进入。Hershey[5]曾指出，进入細胞的物质，即彼所謂的“发芽物质”为 97% 脫氧戊糖核酸和 3% 蛋白质所組成，但要肯定某一成分較另一成分更具有噬菌体的遺傳功能，在目前尙不可能。但是，Herriott[6]认为从細菌的轉移因素的本质来看，并且从結构方面考慮，脫氧戊糖核酸似乎是一个較为吸引人們注意的进入細胞的选擇性物质。这种見解为 Doermann、Chase 和 Stahl[7] 从受紫外光作用失去活力的噬菌体去找寻其中未被发現的遺傳信息載体的研究結果以及 Stent[8] 用同位素示踪作同样研究所得的結果所証实。核酸在生物作用过程中所产生的独特作用的进一步証明来自 Fraenkel-Conrat[9] 与 Gierer 和 Schramm[10] 的各自独立的观察，即从烟草花叶病毒分离出来的戊糖核酸具有病毒的活性，而这些活性可以认为差不多完全为天然病毒或从解离出来的核酸与蛋白质再結合而成的再生病毒所具有的活性。

从这些研究結果曾經明显地証明，一度所认为的遺傳信息的主要密碼存在于染色体中的蛋白质部分的概念必須予以擯弃，而現在一般均承认这种具有遺傳性质的主要物质为脫氧戊糖核酸；只有在植物病毒中戊糖核酸才代替了脫氧戊糖核酸[11]。

要使核酸能够傳递遺傳信息，必須有一个模板或密碼与核酸的化学結构相結合。核酸为一互聚合体，其单体核苷酸为一个嘌呤碱或嘧啶碱与一个磷酸糖酯相結合的化合物。在任何一个核酸中只有一种糖，但一般均含有四个不同的嘌呤碱或嘧啶碱。虽然关于嘌呤碱和嘧啶碱的排列次序尙未有直接的知識，但是这些碱基为核酸中的唯一可以变换的成分的事实指出它們具有一定次序的排列，而这种排列就构成了遺傳的密碼。核酸分子的长度各不相同，它不特决定于用作提取的特种組織。但从某一組織中提取出来的制备物亦一定不相同，象沉降系数的广大分布所表示的[12,13]。这种不均一性可以部分地在提取时人为地产生。但是，由于观察到用阴离子交換剂[14,15] 进行的核酸分級分离表示出洗脫液的成分与沉降系数間存在着相互的关系，并且在級分內的沉降系数分布

特别狭窄，所以出現了不同基因的核酸分子具有不同长度的可能性。因此遺傳密碼除与嘌呤碱或嘧啶碱的排列次序有联系外，它还可以从核酸分子的长度来加以判定。

研究核酸，特别研究其生物学功能，近年来已因1953年Watson和Crick[16]所建議的脫氧戊糖核酸的結构模型而大大地受到鼓舞。这个結构模型除小部分被修改外，現已被广泛承认为脫氧戊糖核酸的基本結构。这个将在后面几章中詳細討論的核酸結构包括两条多核苷酸鏈，以相反的方向相互纏繞成双螺旋体，彼此通过嘌呤碱和嘧啶碱所成的特殊氫鍵連結在一起。这样由嘌呤碱和嘧啶碱互补排列所成的两条多核苷酸鏈使Watson和Crick认为核酸分子可以用一条多核苷酸鏈作为另一条多核苷酸鏈的模板而直接自行复制。这个令人兴奋的建議却引起了很多問題，其中包括这两条纏繞在一起的多核苷酸鏈的分开以及Delbrück和Stent[18]所詳細討論过的几个复制方法的修改。虽然Watson和Crick所建議的原来核酸結构及其复制机制均曾經修改，但他們根据几个不同实驗室所累积的化学的与物理的証据所作出的貢献，在核酸知識的发展方面可算是一个划时代的事件。

核酸的发現为Miescher研究工作的結果。他在1868～69年在Tübingen城Hoppe-Seyler的实驗室工作时从膿細胞的細胞核中提取出一种物质，他称之为‘核素’(Nuclein)。这个具有酸性的物质特別使人感到兴趣，因为它含有相当高的磷成分，而在当时所知道的生物組織中所含的有机化合物只有卵磷脂含磷。Miescher把他的工作告知Hoppe-Seyler，他感到非常有兴趣而惊奇，因此他亲自重复了Miescher的膿細胞的实驗，并且請他的两个学生Plósz和Lübavin用除膿外的物质(如蛋黄、酵母、乳酪和鳥类及爬虫类动物的紅血球)来檢查Miescher的方法。当‘核素’的发現被确定后，Miescher和Hoppe-Seyler及其学生的工作即于1871年[19]发表于Hoppe-Seyler的*Medicinisch-chemische Untersuchungen*杂志中。继后Altmann[20]，即‘核酸’一詞的創始者，发表了‘核素’的簡便的一般制法。

不幸得很，Miescher 充分証明核酸为高聚物的工作被后来的研究工作者們所忽視，他們利用有机化学中的降解方法将用酸和碱并用加热处理的方法从組織中提取出来的物質作为研究。用这样提取方法所得的产物，虽然只适宜于作为核酸水解产物的检查和核酸降解产物的研究，但与天然核酸很少相似之处。

許多根据利用降解物質进行研究而作出的假定常导致錯誤的結論，其中有些还严重地阻碍着关于核酸結构与功能的知識的进一步发展。例如，过去将近 10～15 年間认为核酸分子是一个四核苷酸的概念是由于发現酵母核酸的水解物中含有 4 个几乎等分子比例的核苷酸分子以及以后被証明是錯誤的[22]分子量的測定[21]而来的。这个錯誤的測定表示核酸粒子的大小相当于 4 个核苷酸分子。但是不管这样的批判，利用古典有机化学的方法以进行降解的研究对于确定組成核酸的基本分子仍具非常重要的意义。

从这个工作的結果产生了核酸存在着两种显然不同类型的概念。一种是从酵母而来的核酸，当水解时产生腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、磷酸和一种被 Hammarsten 认为是一种戊糖，而 Levene 和 Jacobs[23] 則确定为核糖的糖。另一种是从胸腺而来的核酸，水解后产生腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶（5-甲基尿嘧啶）、磷酸和一种被 Levene 和 London[24] 认为是脫氧戊糖，而 Levene、Mikeska 和 Morri[25] 則确定为脫氧核糖的糖。这两种核酸因而分别叫做核糖核酸和脫氧核糖核酸。因为大部分动物来源的核酸类似从胸腺所得的核酸而植物来源的核酸类似从酵母而来的核酸，因此一般均认为戊糖核酸具有植物的特征，而脫氧戊糖核酸則具有动物組織的特征。

但是这样的区分永远不能避免人們的反对，而且当这样的区分开始时，即不断有例外的发現。它的不准确性的有力証明来自 Brachet[26] 的組織化学的研究，Caspersson[27] 所介紹的組織的紫外分光的測定以及 Davidson 和 Waymouth[28] 的細胞化学成分的分析等。細胞和組織的化学成分的更准确的分析已因紙层析[29~31]和离子交换技术[31]的使用而变为可能。根据这些研究的結果，一

般均断定細胞质中的組分包含有戊糖核酸，而細胞核中的組分則包含有脫氧戊糖核酸和一小部分戊糖核酸。因此人們証明这两种核酸均存在于所有类型的細胞中，不論其为植物来源的或动物来源的，并且也指出戊糖核酸和脫氧戊糖核酸在生物学方面的主要区别在于戊糖核酸主要存在于細胞质中，而脫氧戊糖核酸則完全或几乎完全存在于細胞核中。

核酸中糖的鉴定仅严格地进行过几次。到目前为止，从核酸中分离出来的糖仅为 D-核糖和 2-脫氧-D-核糖两种。在酵母[23]和肝中[33]的戊糖核酸所含的戊糖曾被确定为 D-核糖，但从层析的結果証明此种核糖与大部分其他来源[31]所得到的戊糖核酸中的 D-核糖相同。从胸腺中所得到的脫氧戊糖核酸中的脫氧戊糖已被确定为 2-脫氧-D-核糖[25]，但是用层析方法[30]証明从其他来源所得到的脫氧戊糖核酸中的糖亦与 2-脫氧-D-核糖相同。在本书中‘戊糖核酸’与‘脫氧戊糖核酸’将作为属名在书中各处使用，除非在个别的地方涉及某些特殊的、成分已知的核酸时則不采用此属名。

(施嘉鍾 譯)

参考文献

[1] Avery, O. T., Macleod, C. M. and McCarty, M. *J. exp. Med.* 1944, **79**, p. 137

[2] Griffith, F. *J. Hyg., Camb.* 1928, **27**, p. 113

[3] See Zamenhof, S. *Progr. Biophys.* 1956, **6**, p. 86; *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 351

[4] Hershey, A. D. and Chase, M. *J. gen. Physiol.* 1952, **36**, p. 39

[5] Hershey, A. D. *Virology* 1955, **1**, p. 108

[6] Herriott, R. M. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 399

[7] Doermann, A. H., Chase, M. and Stahl, F. W. *J. cell. comp. Physiol.*

1955, **45**, Supplement 2, p. 51

[8] Stent, G. S. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1953, **39**, p. 1234
Stent, G. S. and Fuerst, O. R. *J. gen. Physiol.* 1955, **38**, p. 441

[9] Fraenkel-Conrat, H. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 882
See also Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. A. and Williams, R. C. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 501

[10] Gierer, A. and Schramm, G. *Nature, Lond.* 1956, **177**, p. 702

[11] Glass, B. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 757

[12] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, p. 734; *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 705

[13] Schumaker, V. N. and Schachman, H. K. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **23**, p. 628

[14] Bradley, D. F. and Rich, A. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 5898

[15] Bendich, A., Pahl, H. B., Rosenkranz, H. S. and Rosoff, M. *Symp. Soc. exp. Biol.* 1958, **12**, p. 31

[16] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Nature, Lond.* 1953, **171**, pp. 737, 964

[17] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1953, **18**, p. 123

[18] Delbrück, M. and Stent, G. S. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 699

[19] Miescher, F. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 441
Plósz, P. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 461
Lübavin, N. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 463
Hoppe-Seyler, F. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 486
Miescher, F. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 502

[20] Altmann, R. *Arch. Anat. Physiol., Lpz.* 1889, p. 524

[21] Myrbäck, K. and Jorpes, E. *Hoppe-Seyl. Z.* 1935, **237**, p. 159

[22] Fletcher, W. E. *Thesis*, University of London, 1948

[23] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1909, **42**, pp. 2102, 2469, 2474, 2703

[24] Levene, P. A. and London, E. S. *J. biol. Chem.* 1929, **81**, p. 711 and **83**, p. 793

[25] Levene, P. A., Mikeska, L. A. and Mori, T. *J. biol. Chem.* 1930, **85**, p. 785

[26] Brachet, J. *Arch. Biol., Liège* 1933, **44**, p. 519; 1937, **48**, p. 529; 1940, **51**, pp. 151, 167; *C. R. Soc. Biol., Paris* 1940, **133**, pp. 88, 90

[27] Caspersson, T. *Skand. Arch. Physiol.* 1936, **74**, Supplement 8
Caspersson, T. and Schultz, J. *Nature, Lond.* 1939, **143**, p. 602
Caspersson, T. *J. R. micr. Soc.* 1940, **60**, p. 8
Caspersson, T. and Schultz, J. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1940, **26**, p. 507
Caspersson, T. *Naturwissenschaften* 1941, **29**, p. 33
Caspersson, T. and Thorell, B. *Chromosoma* 1941, **2**, p. 132
Caspersson, T., Nyström, C. and Santesson, L. *Naturwissenschaften* 1941, **29**, p. 29; *Acta radiol., Stockh.* 1942, p. 46

[28] Davidson, J. N. and Waymouth, C. *Nature, Lond.* 1943, **152**, p. 47; *Biochem. J.* 1944, **38**, pp. 39, 375, 379

[29] Wyatt, G. R. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 243

[30] Chargaff, E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 307

[31] Magasanik, B. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 373

[32] Cohn, W. E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 211

[33] Davidson, J. N. and Waymouth, C. *Biochem. J.* 1944, **38**, p. 379

第二章 核酸的提取

引 言

研究核酸的目的和許多生物化学研究的目的相同，是将提取出来的核酸的化学結构和反应性能与它在生物机体中的功能联系起来。高分子量和結构复杂的細胞成分的提取必然要涉及这样的問題：提取出来的制备物是否在各方面都和細胞中的原物质相同。合乎理想的提取方法必須能使所得到的制备物在每一点上都能保持它在原来細胞中的結构。但是，細胞中的核酸总是和蛋白质結合在一起的。现在还不能說，究竟細胞中所有的核酸是否都以核蛋白的形式存在。但是毫无疑問，即使不是所有的核酸，至少是大部分的核酸是以具有生物活性的核蛋白形式存在。核蛋白可以在一定程度上以不发生变化的状态被提取出来，但是很难区别天然的核蛋白与从細胞中同时提取出来的蛋白质和核酸所形成的类似蛋白质核酸盐那样的矯作物。曾經采用过許多方法从蛋白质中分离出核酸。但是，不論这些方法是温和的或是激烈的，一个事实总是存在，即細胞中的核酸若使是和蛋白质結合在一起，則原来和蛋白质結合的基团将被釋放出来，并且很可能有引起副反应的危險。

核酸的提取还因缺乏对它在細胞中的眞正功能的了解而更加复杂起来。核酸和多种蛋白质（例如酶和抗体等）不同，它并不具有容易衡量的生物活性，所以拟定一种能令人滿意的核酸提取方法的标准要比在相似的情况下拟定蛋白质的提取方法的标准困难得多，因此經常采用很多随意制定的标准，其中包括化学分析、分子量测定、紫外吸收光譜、粘度以及酸、碱滴定等。严格地說，这些标准只能用于制备方法之間的相互比較，并且在比較时还要利用

一些并不一定正确的假設，例如分子量愈高則制备方法愈好等。所以应当强調指出，不能象对某些蛋白质和病毒那样，現在对一个滿意的核酸制备方法还沒有絕对的标准。

Miescher[1]、Altmann[2] 与 Kossel 和 Neumann[3] 最初所叙述的核酸制备方法是根据这样的假定来設計的，即核酸是不稳定的物质，在活性試剂和加热处理下会发生根本的变化。这个假定至今被公认为是正确的，因此所有近代的制备方法都尽可能地采用最温和的条件。可是在 1899 年 Neumann[4] 描述了一个改进 Altmann 法的方法，这个方法包括将切碎的生物器官在 3% 氫氧化鈉溶液中进行加热，这在以后 30 年的时間中一直是制备核酸的典型方法[5]。因此 Levene 和 Bass[6]說：'已經消除了对用激烈的方法从蛋白质中分离核酸的傳統顾虑'。

这个发展可能加速了运用有机化学中的古典方法以研究核酸的水解产物，然而这也是采納一个极端錯誤的核酸分子量数值的原因。因此，虽然当时 Miescher 和 Kossel 可能都已經意識到核酸的复杂性质及其巨大分子結构，而后来的工作者却认为核酸的分子还是比較小的。这个見解一直都沒有被怀疑过，直到重新采用温和方法制取核酸时，核酸的大分子性质才又重新被人們认識。

細胞中的核酸是和蛋白质紧密地联結在一起的。在核酸的制备过程中最困难的步驟是将核酸从蛋白质中分离出来。現在的分离方法通常分为两个步驟。首先是核蛋白的提取，它可以以固体的状态，或不以固体的状态被提取出来。其次是使核酸与蛋白质分离。在这个方法中，当脫氧戊糖核酸和戊糖核酸都是和蛋白质結合在一起时，戊糖核酸与脫氧戊糖核酸的分离是根据 Mirsky 和 Pollister[7] 所描述的方法，即利用这两种核蛋白在电解质溶液中溶解度的显著差别来进行分离。过去在核酸与蛋白质分离后用以分离戊糖核酸和脫氧戊糖核酸[8] 以及采用强烈試剂的方法，都不能令人滿意。

脱氧戊糖核蛋白的提取

除用酸或碱的方法外，提取核精蛋白和核組蛋白有两种主要方法。这两种方法的差别在于从細胞組織中提取核蛋白时所用溶液的离子强度不同。第一种方法是用水或低离子强度的溶液[9~28]；第二种方法是用高离子强度的溶液[7,29~39]。提取脱氧戊糖核酸这两种方法均可应用；但是制取核蛋白則以第一种方法为佳，因为有相当多的証据証明，在氯化鈉的濃溶液中（$1M$）将发生核酸和蛋白质的解离[7,12,26,36,37,40~42]，并且在沉淀时形成一种在某些細节方面和原来核蛋白不相同的蛋白质核酸盐。

利用脱氧戊糖核蛋白在不同电解质[7]溶液中溶解度的显著不同，可以使这种核蛋白和戊糖核蛋白完全分离。Frick[36]曾詳尽地探討过脱氧戊糖核蛋白在不同濃度的氯化鈉溶液中的溶解度問題，他指出在 $0.14M$ 氯化鈉溶液（生理盐水）中，脱氧戊糖核蛋白的溶解度只及它在純水中的溶解度的 1%，而在 $1M$ 氯化鈉的溶液中，它的溶解度至少是在水中的两倍。因此脱氧戊糖核蛋白在 $0.14M$ 氯化鈉溶液中的溶解度最低。相反的，戊糖核蛋白通常比較容易溶解，尤其是能够在 $0.14M$ 氯化鈉溶液中溶解。因此用 $0.14M$ 氯化鈉溶液洗滌切碎的組織可以使脱氧戊糖核蛋白与戊糖核蛋白分离。

在从細胞中提取核蛋白时，必須防止酶降解；若是不可能防止，至少也要使酶降解减少到可以忽視的程度。大多数細胞中似乎都含有对核酸为特异的解聚酶。在提取时，在同一溶液中这种酶和核蛋白都以游离状态存在，因此有可能相互起反应。为了减少或阻止酶的作用，曾經提出过許多預防的方法。例如，所有的制备过程均应在 0°C 或更低温度下进行以降低酶反应的速度；通常还要加入酶的毒物如砷酸盐[18]、檸檬酸盐[34]、氟化物[33]或螯合剂如乙二胺四乙酸鈉等以进一步抑制酶的作用。

已經强調过，在核酸和核蛋白的提取过程中必須避免加热以

及使用能使 pH 显著偏离中性的强烈化学試剂。此外，如 Chargaff[43] 所首先指出的，也要避免使用高速絞碎器。現在已經肯定，在制备过程中过多地使用高速絞碎器(拌和器或匀浆器)会使大分子发生降解。这可能是由于局部受热或超声波空穴化作用所造成的后果。但是，为了打碎細胞，似乎仍有使用这种絞碎器的必要，但使用的时間应尽可能地縮短。

以下列举两种典型的制备方法，一种用低离子强度的溶液，另一种用高离子强度的溶液。

用低离子强度溶液制备小牛胸腺核組蛋白[26]

将刚宰杀的小牛的胸腺除去油脂后，立即冰冻并迅速加以处理。往后的全部操作均須在 4～6°C 的冷室中进行。将每份 50 g 的胸腺在一装有切削刀片的高速混和器中与 50 ml 預先調整到 pH 7 的、含有 0.1M 氯化鈉和 0.05M 檸檬酸鈉的、冰冷的混和液共同搗碎 30 秒钟。然后用离心机在 2000 g 下轉离 30 分钟，弃去上层清液。将所得沉降物重新悬浮在 100 ml 同样的氯化鈉-檸檬酸鈉溶液中，再进行轉离。这样的洗滌可以重复进行。

为了除去电解质，将沉降物重新充分悬浮在水中，并加以轉离。用这样的方法洗滌三次，每次用預先經碳酸氢鈉調节到 pH 7 的蒸餾水 50 ml。在最后一次的洗滌中沉降物应当发生膨脹，但不大溶解在上层清液中。将此胶状沉降物在高速混和器中与 250 ml 蒸餾水 (調节到 pH 7) 共同拌和 15 秒钟，并搖震过夜。此时应成极粘稠的溶液，这个溶液在高速混和器中攪拌一些时間后，在离心机中在 2000 g 下轉离 30 分钟。然后加入計算量的氯化鈉溶液 (約 0.2M) 使水溶液的濃度相当于 0.15M 氯化鈉以沉淀核蛋白。經轉离 30 分钟后，将沉淀出的核蛋白在离心机中用 0.15M 氯化鈉溶液洗滌，最后迅速用少量蒸餾水洗滌一次。

用高离子强度的溶液制备小牛胸腺核組蛋白[7,37]

用上述方法制取小牛胸腺。往后的全部操作均必須在 4～6°C 的冷室中进行。将每份 50 g 的小牛胸腺在一装有切削刀片的高速混和器中与 50 ml 預先調节到 pH 7 的含有 0.1M 氯化鈉和 0.05M 檸檬酸鈉的冰冷的混合液共同拌和 30 秒钟。用离心机在 2000 g 下轉离 30 分钟，弃去上层清液。将沉降物重新悬浮在 100 ml 氯化鈉-檸檬酸鈉溶液中，再加以轉离，这样的洗滌可以重复进行。

将所得沉降物悬浮于 100 ml 0.15*M* 氯化鈉溶液中，用高速混和器攪拌 15 分钟，再加 10% 的氯化鈉溶液，使溶液的氯化鈉濃度提高到 5%。静置 24 小时后，将所得的粘稠溶液用粗滤器过滤，滤液加水稀釋到 0.15*M*，使核蛋白沉出。用离心机轉离 30 分钟，然后收集核蛋白沉淀。再将沉淀加入到 100 ml 5% 氯化鈉溶液中，并在高速混和器中攪拌 15 秒钟，使其重新溶解。将溶液稀釋到 0.15*M*，使沉淀再析出。用轉离方法收集沉淀，并用少量蒸餾水迅速洗滌一次。如果需要干燥的制品，則最好在冷冻状态下干燥。

上述制备方法及其改进法均曾被应用于从多种組織中制取脫氧戊糖核蛋白。其他各种方法也曾有所报道[44~47]，但这些方法和常用的方法相比时似乎并沒有什么突出的优点。但是，某些核蛋白的制备，特别是从某些細菌中制取时，就需要用不同的方法，例如用稀的緩冲溶液[48]提取等。

Doty 和 Zubay[27] 曾对上述脫氧戊糖核蛋白的制取方法进行了批評，主要是因为最后所得的核蛋白溶液具有凝胶的性质，而且在溶液中又不能完全分散[24]。他們认为凝胶的不可逆形成的原因是：(1) 保持核蛋白溶液的濃度在 0.08% 以上，(2) 用 0.15*M* 氯化鈉溶液或乙醇沉淀核蛋白，或 (3) 使盐水洗过的沉降物在水中勻浆前放置过久和勻浆得太慢。用下述方法取得的、在 pH 6.8 的 0.0007*M* 磷酸鉀緩冲液中的核蛋白溶液可以避免核蛋白的沉淀。

用 Doty 及 Zubay[27] 的方法制取小牛胸腺的核組蛋白

在冷室中将 20 g 新鮮、冷冻的胸腺切碎，并与 200 ml 調节到 pH 8 的 0.075*M* 氯化鈉溶液和 0.24*M* 乙二胺四乙酸鈉溶液及几滴辛醇所組成的混合液在高速絞碎器中打成勻浆（在絞碎时先以一半轉速开动 1 分钟，然后再用仅足以产生攪拌的极慢速度再攪拌 3 分钟）。用粗布扭滤勻浆，滤液以 2000 轉/分的轉速轉离 10 分钟。再将沉降物放在同体积的溶液中用高速絞碎器打成勻浆（慢速攪拌 3 分钟）。如前再用离心机轉离，傾出上层清液。重复这样的洗滌 6 次。将最后所得的沉降物在絞碎器中与水迅速混和，使其溶解，起初用 50 ml 水，随即在几秒钟內加水到 1 升。将混和物立即移入燒杯中攪拌 1 小时，然后对 pH 6.8 的 0.0007*M* 磷酸鉀溶液进行透析。

Doty 和 Zubay 主要根据顆粒大小和 N/P 比值的測定，认为用上述方法可以获得染色体的主要結构单位，并且核蛋白不論在

那一方面都沒有改变其原来的‘天然’状态。但是，这种方法最近又受到 Dounce 和 O'Connell[28] 的批評。他們认为由于核蛋白溶液的存在，凝胶的形成是不可避免的，而这种現象是未受損伤的脱氧戊糖核蛋白存在的特征。在这里脱氧戊糖核酸很可能是以共价鍵和脂蛋白部分相連[49]。因此他們认为 Doty 和 Zubay 所采用的制取方法会产生一种由几种組分所組成的复杂物质，与 Mirsky 和 Pollister[7] 以及 Mirsky 和 Ris[50] 原先所获得的染色体并无区别。因此他們作出这样的推断：Doty 和 Zubay 所认为他們的方法能够用以制取一种染色体結构的基本单位的說法是缺乏实驗根据的。

脱氧戊糖核酸鈉的提取

要提取一个脱氧戊糖核酸的大分子样品，在整个制备过程中所用的溶液都必須具有接近中性的 pH 值。因此提取所得的产物是它的鈉盐而不是游离的核酸。这种事实現在已得到普遍的承认，虽然这样的制备仍常被不大正确地称为核酸的制备。提取脱氧戊糖核酸鈉最后所得的产物应当不含有蛋白质、多糖、类脂质等杂质，以及戊糖核酸和无机盐等。一般而言，在所用的方法中应当只采用溫和的試剂。此外象上面所說的，加热、加酸、加碱以及过多地使用絞碎器等都应当避免。还应当强調指出，不但在制备过程中要避免加热，而且在以后配制供物理化学研究用的溶液时也需要避免加热，因为 Peacoke[51] 曾指出过，在 110°C 下眞空干燥样品时会产生不可逆的变化。

最近，主要根据 Thomas[52] 用分光光度法研究的結果，已經明白在低濃度的核酸盐溶液中使氯化鈉或其他中性无机盐的濃度降低到 $10^{-3}M$ 以下时，将使核酸的結构产生不可逆的改变。因此，使用彻底的透析使脱氧戊糖核酸溶液中的氯化鈉含量降低到这个限值以下的做法必須避免。

除非用极其概略的說法，否则是不可能提出一个满意的制备

方法的标准。因此虽然已經知道一个满意的制备物必須具有高的分子量，它的水溶液又必須具有高的粘度，但仍无法提出所要求的准确分子量和特性粘数。虽然如此，Chargaff[53] 曾提出一个有用的标准，并已成功地为好几个实驗室所采用。这就是在 pH 7 时含有氯化鈉(濃度$>10^{-3}M$)的脱氧戊糖核酸的溶液在 257 和 261 $m\mu$ 之間的紫外最大吸收的 ϵ(P) 值必須在 6600 左右〔ϵ(P) 表示每克原子磷的消光系数〕。

通常从大多数組織中提取脱氧戊糖核酸所用的正規方法和上述方法相似，都是先使核蛋白(或蛋白质核酸盐)以干燥固体的状态，或更好地以溶液的形式分出，然后再除去蛋白质而提取出脱氧戊糖核酸的鈉盐。除去蛋白质的主要方法共有四种。

Hammarsten[40] 提出了一种方法，以后 Signer 和 Schwander[54] 又加以改进。在这个方法中，当溶液中的核蛋白被提出后，加氯化鈉至飽和即可使蛋白质沉淀出来。蛋白质在四天內逐漸沉淀完毕。这个方法沒有被广泛采用，可能是因为使蛋白质沉淀所需要的时間太长，并且最后的痕量蛋白质仍不易除尽。

Gulland、Jordan 和 Threlfall[35] 采用了 Sevag[55] 及 Sevag、Lackman 和 Smolens[15] 所介紹的方法以除去任何溶液中的可溶性蛋白质。这个方法是将含有少量去泡沫剂(如戊醇)的溶液与氯仿或四氯化碳共同搖振。这样就产生了一种稳定的凝胶，而蛋白质被吸附在水-氯仿界层上。将凝胶在离心机中用轉离方法除去，剩下的溶液就含有較多的核酸。若要除去所有的蛋白质，需要进行多次这样的乳化作用。虽然这个方法存在一些缺点，但是可以得到沒有蛋白质的脱氧戊糖核酸。

現在最常用的方法是用阴离子型去污剂解离核蛋白复合物同时使蛋白质沉淀。1938 年 Sreenivasaya 和 Pirie[56] 首先采用表面活性物质分离烟草花叶病毒中的蛋白质和核酸。所用的阴离子型去污剂是硫酸十二酯鈉。以后在 1940 年 Bawden 和 Pirie[57] 又証明，当有碱存在时，硫酸十二酯鈉能立即使核酸从几种病毒的蛋白质中分出。但是在 1951 年，Marko 和 Butler[58] 及 Dounce、Sim-

mons 和 Kay[59] 提出采用硫酸十二酯鈉以前，这个方法沒有被发展为制备脱氧戊糖核酸的方法。以后 Dounce、Simmons 和 Kay 三人又詳細地报道了他們的方法[60]，从此以后这个方法才被广泛地采用。虽然硫酸十二酯鈉最常被采用，但是幷沒有理由使人們相信它的作用是特异的，其他阴离子型去污剂也同样用之有效[60,61]。这种方法通常能产生一种无蛋白质的制备物，虽然不一定常常如此[62]。如能接着再用一次氯仿-乳化方法，則更能保証得到不含有蛋白质的制备物，虽然这幷不是經常需要如此(参見下面)。

最后一种方法是 Butler、Conway 和 James[63] 所用的酶降解去除蛋白质的方法。这个方法除在 Butler 的实驗室中应用外，还沒有被广泛采用。

下面将詳述这四种常用的方法。值得推荐的是 Kay、Simmons 和 Dounce[60] 所用的阴离子型去污剂沉淀蛋白质的方法，因为經驗証明，这个方法可以生成一种沒有分級作用或很少分級作用的可以复制的脱氧戊糖核酸制品。幷且它还有一个优点，卽阴离子型去污剂旣能解离核蛋白絡合物使它分离成为核酸与蛋白质，同时又能使蛋白质沉淀。至于其他方法，例如氯仿-凝胶方法，这似乎是只有被解离出来的蛋白质才能成凝胶而被除去，幷且为了促使解离，需要有高濃度的氯化鈉溶液，可能同时还需要用乙醇来沉淀核蛋白絡合物。缺少了沉淀步驟会导致产率的减低，幷使凝胶中含有核酸。

用阴离子型去污剂的提取方法[60]

将 50g 新鮮的小牛胸腺切碎，在高速絞碎器(Waring 攪拌器)中与200ml 冰冷的含有 0.01*M* 檸檬酸鈉的 0.9% 氯化鈉溶液共同攪拌 1 分钟使成匀浆(Kay、Simmons 和 Dounce[60] 推荐攪拌 3 分钟，但为了避免降解，攪拌的时間应尽量縮短)。将匀浆在 0°C 下，以 2500 轉/分的轉速轉离 30 分钟，弃去上层清液。将沉降物与氯化鈉-檸檬酸鈉溶液制成匀浆，然后在离心机中轉离，用这样的方法进行洗滌三次。洗滌后的沉降物用 1 升冰冷的 0.9% 氯化鈉溶液在高速絞碎器中攪拌 1 分钟，然后移入大燒杯中，幷加入 90 ml 去污剂溶液(每 100 ml 45% 乙醇中含硫酸十二酯鈉 5g)，同时加以攪拌。将所生成

的凝胶在室温下剧烈攪拌3小时。在攪拌过程中，凝胶逐渐变成极粘的糖浆状溶液。

加氯化鈉55 g使溶液中氯化鈉的濃度变为1*M*。这样会使溶液粘度显著下降。继續攪拌5～10分钟以保証氯化鈉完全溶解。氯化鈉的濃度不可超过这个限度，因为濃度过高会使去污剂析出。

将溶液在室温下以2500轉/分的轉速轉离（或在更高的轉速下使产生更澄清的上层液）以除去蛋白质沉降物。加乙醇（95%）于上层清液中并同时加以攪拌。这样就生成一种高度凝胶状的沉淀，这个沉淀逐渐失水变成白色的纤維状物质，它可以被卷繞在攪棒的棒端。挤去包含在沉淀中的上层液体，然后用95%乙醇将沉淀洗滌三次，再用丙酮洗滌，直至洗滌液不呈混浊为止。将粗制品在空气中干燥，产量約2 g。粗制品中含有少量蛋白质杂质。

在室温下将此粗制品悬浮于700 ml蒸餾水中并快速攪拌（約2小时）使其溶解。当溶解完全后，加去污剂溶液63 ml，并继續攪拌1小时。加氯化鈉45 g使溶液的氯化鈉濃度变为1*M*，然后以13000轉/分的轉速轉离至少1小时。取出上层清液，加入等体积的95%乙醇使脫氧戊糖核酸盐析出，并将其洗滌如前。将产物放在700ml蒸餾水中，在室温下攪拌1小时使再溶解。加氯化鈉6.3 g使溶液的氯化鈉濃度变为0.9%。在这个濃度下制备物中的任何殘留的蛋白质都将同极少量的脫氧戊糖核酸鈉一同沉出。将溶液在室温下以13000轉/分的轉速轉离1小时。加氯化鈉35 g，使上层清液的氯化鈉濃度提高到1*M*；再在攪拌下小心加入95%乙醇使脫氧戊糖核酸鈉慢慢沉出。所产生的纤維状产物如前法用乙醇洗滌，继以丙酮洗滌，直到丙酮洗液澄清为止，然后在空气中干燥（产量1.3～1.4克）。

另一种沉淀方法是在整个过程中都用压縮空气将核酸盐的水溶液以細雾状态噴入95%乙醇或无水乙醇中，所得沉淀用上述方法卷在棒上。若由于某种原因需要从純淨水溶液中沉淀出脫氧戊糖核酸盐而不是从1*M*氯化鈉溶液中沉淀出时，则这种沉淀方法显得特别有价值。

下列方法最初是由Gulland、Jordan和Threlfall[35]在极大規模下进行的（由54.5 kg小牛胸腺开始）。因为这样規模的制备很愚拙，而且亦无必要，因此在下面叙述一个規模較小的制备方法。这个方法和Chargaff[64]所述的方法相似：

用濃氯化鈉溶液提取的方法；用氯仿-凝胶方法除去蛋白质[35]

整个操作过程都要在4°C冷室中进行。将250 g新鮮小牛胸腺切碎，并

与 500 ml 含有 0.1*M* 氯化鈉溶液和 0.05*M* 檸檬酸鈉溶液的混合液在高速絞碎器中共同攪拌 1 分钟制成匀浆。混合液的 pH 必須調节到 6.8 与 7.0 之間。在 2500 轉/分的轉速轉离下所成的沉降物用氯化鈉-檸檬酸鈉溶液通过制成匀浆的方法洗滌两次。将这样处理的組織悬浮在 1250 ml 10% 氯化鈉溶液中制成匀浆，这时溶液的粘度显著增加。在提取 48 小时后，将溶液用粗布扭滤，并在 Sharples 离心机中以 20000 轉/分的轉速轉离，使溶液澄清。将澄清溶液加入到 1.5 倍体积的乙醇中，使核蛋白絡合物沉出。沉淀用轉离方法或将其卷繞在攪棒上收集起来，然后再依次用 70% 和 95% 乙醇洗滌，最后在眞空中干燥。

将核蛋白用快速攪拌使其悬浮于 2 升 10% 氯化鈉溶液中。这时核蛋白很少会全部溶解，因为沉淀操作使一部分蛋白质发生变性。将等体积的氯仿-戊醇混合液(按 3:1 混合)加入到此溶液中，并在高速絞碎器中攪拌 30 秒钟，使成匀浆，再用 2500 轉/分的轉速轉离。收取上层清液，重复进行此項去除蛋白质的手續，每次减少氯仿-戊醇混合液的用量，直到在水-氯仿的界面层中沒有凝胶为止。这样的操作通常需要进行 8～12 次。将上层清液加到两倍体积的 95% 乙醇中，收集所得的沉淀，挤去水分，然后依次用 70%、90% 乙醇和无水乙醇洗滌。最后在眞空或空气中干燥。

用濃氯化鈉溶液提取的方法；用氯化鈉使溶液飽和以除去蛋白质[40,54,65]

将 750 g 小牛胸腺切碎，并与 1.5 升含有 0.1*M* 氯化鈉溶液和 0.05*M* 檸檬酸鈉溶液的混合液分部在絞碎器中打成匀浆。将用 2500 轉/分的轉速轉离所得的沉降物以同样的方法用氯化鈉-檸檬酸鈉溶液再洗滌两次。将这样处理的組織悬浮在 2 升 10% 氯化鈉溶液中，放置 48 小时并不时加以攪拌。在不断攪拌下将溶液傾入 10 倍体积的水中，并在离心机中轉离以分出沉淀。将所得的核蛋白溶解于 5 升 10% 氯化鈉溶液中，加氯化鈉使其飽和，并調整溶液的体积使达到 6 升，并在 0°C 下貯存 12～14 天。

另取 1.5 升含有 500g Celite 545* 的悬浮物的飽和氯化鈉溶液加入到上述所保存的混合液中，攪拌过夜，使沉淀在 Hyflo-supercel** 的帮助下用熔結玻璃漏斗(孔率 No. 4)吸滤。将滤液透析，使氯化鈉的濃度降低到 1*M* 左右，然后将其加到两倍体积的乙醇中以沉淀脱氧戊糖核酸鈉。收集沉淀，挤

---

* 一种硅胶助滤剂(譯者注)

** 一种助滤剂(譯者注)

去水分，用 70% 乙醇洗滌至洗滌液不含氯离子，然后再用无水乙醇洗滌，并在眞空中干燥。

此外也可将核蛋白以核蛋白鈣絡合物的形式再行沉淀一次。当用上述的稀釋方法将核蛋白沉淀后，即可将核蛋白在 1.8 升蒸餾水中用高速絞碎器打成勻浆，并在 0°C 下靜置过夜，然后在离心机中轉离。在攪拌下向所得的上层清液中加入 20% 氯化鈣溶液 5 ml，将沉淀靜置过夜使其澄清，并用离心方法将其集取，用 1% 氯化鈣溶液洗滌沉淀两次，再与 500 ml 10% 氯化鈉溶液混和并打成勻浆。加氯化鈉至飽和，再将此飽和液加到 5 升飽和氯化鈉溶液中。在 0°C 下靜置 3 天后，将沉淀出的蛋白质在 Hyflo-supercel 的帮助下用熔結玻璃漏斗(孔率 No. 4) 如前法吸濾。

用濃氯化鈉溶液提取的方法；用胰凝乳蛋白酶消化以除去蛋白质[63]

将 500 g 新鮮的小牛胸腺用干冰冰冻，然后将其絞碎。将絞碎的組織悬浮于 3 升 0.14*M* 氯化鈉溶液中，并在高速絞碎器中攪拌 30 秒钟使成勻浆。靜置过夜后将此混和物以 2200 轉/分的轉速轉离 40 分钟。弃去上层清液。将剩余物再悬浮于 1 升 0.14*M* 氯化鈉溶液中打成勻浆，并加以轉离，然后用上述的同样方法重复操作两次，每次轉离时間只需 30 分钟。

将沉淀在 1.5 升 0.14*M* 氯化鈉溶液中攪拌使成勻浆。在继續攪拌下加入 20% 氯化鈉溶液 1.5 升。靜置过夜。将溶液的 pH 調节到 7.4～7.8，然后以 24 小时的間隔分两次加胰乳蛋白酶 200 mg，每次加入 100 mg。将溶液在室温下靜置过夜，然后用粗布过濾。濾液加 70% 乙醇 3 升使脫氧戊糖核酸鈉沉出，并用 70% 乙醇洗滌。

将沉淀溶于約 3 升蒸餾水中。在 5°C 下对水透析一星期，每天换水一次。必要时用粗布过濾透析液以除去其中悬浮物质，再用布氏漏斗过濾几次，依次换用更細的 Celite 使濾液澄清。在每升澄清溶液中加飽和氯化鈉溶液 40 ml，再加等体积的 98% 乙醇使核酸盐沉出。将所得纤維状沉淀依次用 70% 乙醇洗滌 3 次，无水乙醇洗滌 2 次，丙酮洗滌 2 次，然后在眞空中用五氧化二磷使其干燥。

其他各种方法

虽然上述几种方法只需稍加修改或不加修改即能用于从大多数哺乳类动物組織中提取脫氧戊糖核酸鈉，但是要从其他来源中，特别是从微生物、病毒、植物組織及精子等提取核酸盐时，就需要

特别設計的技术操作。

最初使用避免使制备物降解的方法从微生物中提取出来的脫氧戊糖核酸是肺炎双球菌中具有遺傳轉移活性的脫氧戊糖核酸[66]。这些脫氧戊糖核酸的提取是将細胞在檸檬酸鈉的存在下用脫氧胆酸鈉溶液溶解后提取出来，再用氯仿-凝胶方法除去蛋白质，最后使其成鈣盐沉出。还有一个相似的方法[67]和用阴离子型去污剂[68]的提取方法均曾应用于从 *Hemophilus influenzae* 中提取出具有遺傳轉移活性的脫氧戊糖核酸。

虽然在这些方法中都是用温和的溶菌方法来裂解細胞，但大多数微生物都需要与玻璃粉共同研磨或用研磨机处理作为提取前的必要步驟。当細菌細胞被裂解后，就可以用上述方法中的一种或将上述方法稍加修改后来进行提取[48,69,70]。一个滿意的从酵母細胞中提取脫氧戊糖核酸的方法就是这样做的[71]。

噬菌体，特别是以偶数編号的 T 組噬菌体，是脫氧戊糖核酸的良好来源。它可用提純的噬菌体来制取[72]。提純的方法是将噬菌体在 95% 乙醇中沉淀后，重新悬浮于 0.2*M* 氯化鈉溶液中，用氯仿-乳化法除去变性的蛋白质。最初三次乳化时用純淨的氯仿，随后用 9:1 的氯仿-辛醇混和物作为乳化剂。但是，这个方法除用于从噬菌体中提取脫氧戊糖核酸外，很少用于从病毒中提取脫氧戊糖核酸。

从植物組織中提取脫氧戊糖核酸的主要困难在于提取出的物质被戊糖核酸所污染；这种污染在提取純粹的核酸的工作中至今还是一个不可克服的困难。虽然从魚和海胆精子和睾丸中提取脫氧戊糖核酸可以按照标准的方法进行，但从哺乳类动物的精子中制取脫氧戊糖核酸时却遇到意外的困难。除非先进行某些降解处理，否则就不可能用濃盐溶液从哺乳类动物精子中提取出核蛋白。例如，要从人类精子中制取一个令人滿意的高聚核酸，就只有先将脫脂的人类精子用胰蛋白酶[73]（不含脫氧核糖核酸酶）处理才能得到。但是，从公牛的精子中制取高聚核酸还必須先用能使核酸发生降解作用的氫氧化鉀作初步提取[74]。

各种脱氧戊糖核酸鈉制备方法的比較

只有对各种制备物溶液的性质进行系統的物理化学的研究之后才有可能对各种制备方法的产品作出适当的比較。这样完整的研究还沒有人做过。但是还是可以找到一些有关前三种制备方法的比較有价值的报道。Frick[75] 曾用 Hammarsten 的方法，Gulland、Jordan 和 Threlfall 的方法以及 Kay、Simmons 和 Dounce 的方法制取了小牛胸腺中脱氧戊糖核酸盐的样品。不幸得很，对这些制备方法只做过定性的研究，而且这些方法的价值只从其产量来討論。虽然如此，Frick 还是断定用 Hammarsten 的方法通常会产生一种混有蛋白质的制品。从 Doty 和 Bunce[76] 及 Reichmann、Rice、Thomas 和 Doty[77] 的光散射的和沉降的研究，以及 Shooter 和 Butler[78] 的离心分級研究都可以得到比較有用的和定量的报道。用氯仿-凝胶方法所得的制品其分子量比用 Signer (Hammarsten) 或 Kay、Simmons 及 Dounce 的方法所得的制品的分子量都低。因此这好象在生成凝胶时发生了一些降解作用。用 Signer 的方法与用 Kay、Simmons 和 Dounce 的方法所得的制品其分子量很相近。从 Shooter 和 Butler 的分級研究发現用氯仿-凝胶方法会产生显著的分級，而用 Kay、Simmons 和 Dounce 阴离子型去汚剂的方法則得到一种具有和核蛋白性质相似的脱氧戊糖核酸。

因此可以断定現在最好的制备方法是 Kay、Simmons 和 Dounce 所叙述的用阴离子型去汚剂来分离核酸和蛋白质的方法，虽然还应該指出，到目前为止所得到的最好的 X-射綫衍射图象却是用 Signer 方法所得的制品。

用上述各种方法制得的脱氧戊糖核酸鈉应为白色的纤維状物质。这种沉淀的纤維状态通常被认为是制品性质良好的一种极籠統的标志，因为降解了的制品一定是粉末。但是纤維状的制品若反复用蒸餾水溶解，然后再用乙醇沉淀，也可使其轉变为粉末[79]。当

溶液中氯化鈉的濃度减低时，核酸就变为可以溶解在乙醇中，而若在 75°C 下小心加入氯化鈉于它的异丙醇溶液中，則可使核酸成粉末状态沉出。这时产物仍具有很高的聚合程度，虽然仍有可能产生一些如 Thomas[52] 所述的那种类型的不可逆轉变，因为它曾經被溶解在低于 $10^{-3}M$ 氯化鈉的水溶液中。

用上述各种方法制得的脱氧戊糖核酸鈉中最可能存在的杂质是戊糖核酸和蛋白质。在这些杂质中，戊糖核酸的去除較为麻煩。如果还有蛋白质存在，只要反复采用适当的去除蛋白质的方法卽可将其除去。在許多动物組織中，戊糖核酸可以在用生理盐水作初步洗滌时以核蛋白的形式除去。在其他情况下，例如从黑麦和小麦[80]中提取核酸时，尤其是从細菌[70]中提取核酸时，这种方法就沒有效果，并且提取出来的制品是一个脱氧戊糖核酸和戊糖核酸的混合物，因此必須采用其他的方法来分离它們。到目前为止还沒有設計出一个眞正完善的方法，这可从过去所尝試的許多方法中看出。它們包括：用冰醋酸将鋇盐分級沉出[8]；将鈣盐分級沉出[71,81]；电泳[48,67,71]；利用核糖核酸酶[71,81]或对碱透析[71,82]除去核糖核酸；若是分子量較低的戊糖核酸，則用活性炭吸收[83,84]；以及用溴化三甲十六銨作分級沉淀[84]等。这些方法很少不受到批評的：分級方法不能做到良好的分离；电泳法很費力而且分离不完全；利用核糖核酸酶的作用会产生一些抗酶級分和一些核糖核苷酸，而碱会使脱氧戊糖核酸降解到某种程度，同时会使戊糖核酸水解成核苷酸。最后两种方法似乎比較最为滿意。

戊糖核蛋白的提取

戊糖核酸比脱氧戊糖核酸对酸、碱的作用更不稳定，因此在提取戊糖核酸及其核蛋白的方法中都同样必須只能采用溫和的試剂。过去所采用的利用酸、碱的方法[85]会生成降解产物，因此将不再討論。

戊糖核酸在細胞中所分布的区域比脱氧戊糖核酸广。虽然后

者几乎只能在細胞核中找到，而前者則在細胞质和細胞核內都有。細胞核中的戊糖核酸約占細胞內核酸总量的十分之一[86]。細胞质中大部分的戊糖核酸是以核酸-脂蛋白复合物的形式存在于顆粒状物质的部分中，虽然在其中也有一部分是可溶性戊糖核蛋白。顆粒状物质經常可以从制成匀浆的組織中用分級离心的方法分出。用分級离心方法分离組織匀浆时会产生核酸-脂蛋白复合物。其他的方法可以将組織用生理盐水提取。所得的提取物是一个含有可溶性核蛋白和顆粒状物质的混合物。

植物和某些动物病毒是戊糖核酸的重要来源。大部分为核蛋白的病毒可以用分級离心或盐分級的方法来提取。

要将所有用于提取戊糖核蛋白的方法一一加以叙述是不切实际的。象提取脫氧戊糖核蛋白一样，沒有一种是广泛适用的方法。因此选擇了几个典型的制备方法叙述如下：

用 0.14*M* 氯化鈉溶液提取的方法[87, 88]

将 350 g 小牛胸腺切碎，悬浮在 1.6 升 0.14*M* 氯化鈉溶液中，并在高速絞碎器中打成匀浆。将此混和物攪拌几小时，然后在离心机中轉离。在所得到的稍带乳白色的上层清液中加 10% 醋酸以調节 pH 至 4.2，这时有大量沉淀出現。将沉降物用离心方法分出，并用 0.5*M* 氯化鈉溶液洗滌，继用水洗，直到洗液中不含有氯离子为止。再将沉降物悬浮于水中，小心加入 0.5*M* 碳酸氫鈉溶液使其溶解。調节混和物的体积至 500 ml。所得溶液在离心机中以 10000 轉/分的轉速轉离使其澄清，再在 pH 4.2 下使沉淀析出。重复这种手續两次。将最后所得的溶液对水进行透析，并使核蛋白在 pH 4.2 下沉出。所得沉淀依次用 70% 乙醇和无水乙醇洗滌，最后在眞空或空气中干燥。

用 0.5 *M* 氯化鈉溶液洗滌的目的是要除去含在第一次沉淀中的脫氧戊糖核蛋白。Kerr 和 Seraidarian[88] 指出，若使这些腺体不是在高速絞碎器中打成匀浆，而只是在切肉机中磨碎，在这种情形下氯化鈉提取液中不含有脫氧戊糖核蛋白，則这种費力的手續就可免去。这样，从碳酸氫鈉溶液中重新沉淀的手續亦可加以避免。这种省略是有利的，因为在这个操作过程中，常从核蛋白中丢失一部分的核酸[88]。

Stanley[89] 原先是用盐分級的方法提取烟草花叶病毒。这个方法曾成功地应用于好几种病毒核蛋白的制取。虽然 Hamoir 曾

满意地用这个方法从鯉魚的肌肉中[90]制得結晶的核原肌球蛋白，但是它并沒有广泛地被应用于核蛋白的提取。应用这种方法的一个卓越的例子是 Markham 和 Smith[91] 的蕪菁黄化花叶病毒的提取。这种病毒特别令人感到兴趣，因为当用乙醇使蛋白质变性时就很容易得到其中所含的戊糖核酸，并且还因为在这种病毒中含有較大百分率的核酸(22%)。

曾經从若干十字花科的植物中制取了病毒。这些植物包括蘿卜、*Brassica carinata*、蕪菁、中国卷心菜以及一种自然感染的硬花甘藍。不論是蕪菁或是中国卷心菜都适宜于作病毒的一般制取。通常，从老的或‘硬’的植物制取病毒比从正在很快生长的‘軟’的植物制取病毒可以得到更高的产量。曾从生长于露天中而发育被阻的蕪菁类植物中制取病毒，每升汁液中病毒的产量高于 1g，但从花房中的植物制取病毒通常产率都在每升 200～500 mg 之間。

盐分級的方法[91]

将經病毒感染过的新鮮的或冷冻过夜的植物切碎并榨取其汁液。假使所用的是田圃的蕪菁，則必須用水压机将其最后一部分汁液榨出。汁液的 pH 通常約在 5.7。在攪拌下按每升汁液 300 ml 的比例緩慢加 95% 乙醇于汁液中使其澄清。所加入乙醇的量差不多达到临界值，因此必須小心量取。这时所形成的大量沉淀应立即放在离心机中用低速(3500 轉/分)轉离 15 分钟。取相当于澄清汁液一半体积的飽和硫酸銨溶液加到上层清液中，将其靜置，最好过夜。几小时后在溶液中就出現大量的細小的八面体結晶，并且晶体随着时間而变大；同时还可以看到許多具有高度折光能力的双折射晶体。这些晶体是无机盐，随后应将其除去。

用离心方法以 3500 轉/分的轉速轉离 30 分钟，收集結晶沉淀，但上层清液在靜置一两天后往往会析出第二批結晶，因此应将其保存。此外，要将所有的細小結晶都用离心方法分离极为困难，因为这些細小的結晶在溶液中不很緊密，因而析出很慢。将含有病毒和許多不溶解物质的結晶沉淀再悬浮在少量的水中(原汁液体积的1/10 至 1/4)或緩冲溶液中，然后再放在离心机中轉离以除去不溶解物质。这种使病毒沉出、继以重新将結晶溶解、然后再放在离心机中轉离以除去細胞碎片的手續需要反复进行几次。在順利的情况下，在这个阶段所制备的病毒已相当純淨。

有好几种方法可以用于进一步的純化。現在所用的方法是用胰蛋白酶将病毒消化，然后用市售的胰浸出液（10 mg/ml）处理，再加几滴氯仿作防腐剂，在保温箱中保温几小时，即可将一些杂质除去。将病毒重結晶几次后可将所含的酶除去。

提純的病毒常含有棕色色素，这可以在病毒在稀乙醇溶液中結晶时除去。将含有約5 mg/ml的病毒和痕量氯化鈉的溶液冷却到0°C，在攪拌下緩緩加入0.25～0.30体积的无水乙醇。当逐滴加入由20 ml无水乙醇，10 ml冰醋酸然后用水稀釋至100 ml配成的溶液时，病毒溶液即变为混浊。若使将此溶液加热，混浊即行消失。若使将此溶液在0°C下靜置几小时，則病毒成細小的、具有双折射的針状結晶析出。在冷却下用离心方法将这些結晶分出（这些結晶在初生成时，可以在室温下溶解）。也可以将溶液在1°C下靜置几天，此时即可看到大量結晶附着在容器底部，于是母液可以很容易地傾出。将所得結晶溶解在0.1*M*磷酸氫二鈉溶液或中性緩冲液中，因为若用清水溶解会产生混浊的悬浮液。此时含有不溶解的带有色素的物质，可以用离心方法以5000轉/分的轉速轉离除去。

分級离心方法曾用于提取經机械碾碎的細胞中的細胞质核蛋白[92]，和提取叶子中的植物病毒[93～95]。

分級离心方法

这个方法可以用黄瓜病毒4的制备为例来說明[93]。采集接种过的植物，并将其在－12°C下冷冻。經过几天后将此植物碾碎。用相当于植物材料的3%重量的磷酸氫二鉀配成濃度为50%的溶液与此植物浆块混和。2小时后从这个冷却的、但已充分融化的浆块中榨出汁液。将汁液用Celite过滤以除去粗顆粒的綠色色素和外来杂质，并在离心机中以20000～30000轉/分的轉速轉离30分钟。这时病毒形成小团块沉出。弃去实际上已不含病毒的上层清液。将小团块病毒溶于少量蒸餾水中。合并病毒小团块溶液，在角式离心机中以3000轉/分的轉速轉离30分钟以除去綠色色素和不溶性胶体物质。将此含有病毒的上层清液再用高速离心机轉离約三次。当病毒变为更加濃縮时，高速离心轉离的时間可以較长。在很多的情况下，发現将头两次用高速离心轉离所得的病毒小团块溶于0.1*M*調节至pH 7的磷酸盐緩冲溶液中，然后再用蒸餾水溶解后两次用高速轉离所得的病毒小团块，可以使病毒中的綠色色素更好地得到分离。所有用作元素分析的制品都应当对流动的蒸餾水透析48小时，以进行进一步的提純。每升汁液中的純化病毒小团块产量为0.1～0.4 g。

戊糖核酸鈉的提取

满意的戊糖核酸制备方法所要求的条件和上述脱氧戊糖核酸的制备方法所要求的条件极为相似。早期的制品通常是从含戊糖核酸特别丰富的酵母中制取。但是，要提取戊糖核酸必須先使酵母的細胞壁破裂。在过去一般所用的方法中常采用碱溶液，因此无怪所得的制品通常都具低的分子量。近来曾发展了几种温和的方法以制取聚合度較高的核酸。但是，戊糖核酸的解聚不仅可以在用化学試剂提取过程中产生，同时也可在用酶提取的过程中产生，因为解聚酶——核糖核酸酶通常总是和核酸共同存在的。在用温和的步驟代替剧烈的化学方法时，必須注意到酶降解的机会也会增加。Bacher 和 Allen[96] 曾确切地証明过在戊糖核酸的提取过程中会发生酶降解。

Clarke 和 Schryver[29] 原先所用的以10%氯化鈉溶液在60～80°C下提取研碎的脱脂酵母中的戊糖核酸的方法曾被 Davidson 和 Waymouth[97] 应用以提取羊肝中的戊糖核酸。以后 Chargaff 及其同工者[98]修改了这个方法并用以提取各种动物的肝中及面包酵母中的戊糖核酸。

Volkin 和 Carter[99] 叙述了从动物組織中制取戊糖核酸的一般方法。在这个方法中利用了蛋白质可以溶解在 $2M$ 盐酸胍溶液中而戊糖核酸則在冷时从这个溶液中沉出的性质。Grinnan 和 Mosher[100] 又改进了他們的方法。已經成功地用作脱氧戊糖核酸的制备的阴离子型去污剂沉淀核蛋白溶液中的蛋白质的方法曾被 Kay 和 Dounce[101] 发展为从动物組織中制取戊糖核酸的通用方法。从酵母提取戊糖核酸尙有困难，因为要提取这个核酸必須先使細胞壁破裂。Crestfield、Smith 和 Allen[102]，以后 Davis 和 Allen[103] 曾設計了一个提取戊糖核酸的方法。这个方法是将熱提取和緩冲溶液結合使用，同时又用硫酸十二酯鈉处理細胞。应用这个方法提取时，則生成一种表面上看来是高分子量的白色而坚

韌的纤維状物质，它的产率相当于酵母中戊糖核酸的 60～70%。

最近曾有人报道一个用苯酚溶液从組織和烟草花叶病毒中提取戊糖核酸的新方法[104~108]。这个方法似乎具有能够抑制核糖核酸酶作用的优点，因而产生了高聚合度的产物，同时也具有能够在提取过程中使蛋白质和脱氧戊糖核酸完全除去的优点。应用这个方法所遇到的唯一困难似乎在于多糖的完全除去。

曾經用过各种各样的方法从植物病毒中提取戊糖核酸。从某几种病毒中分离蛋白质似乎比从其他病毒中容易。Cohen 和 Stanley[109] 在研究烟草花叶病毒的核酸时，用加热的方法使蛋白质变性，因而使其变为不溶解。Dorner 和 Knight[110] 曾对各种从植物病毒中制取戊糖核酸的方法进行了系統的研究。对番茄矮丛病毒所試用过的方法中包括酸、碱、醇、去污剂、蛋白水解酶、声波振动、加热和冷却、盐、丁醇和氯仿、盐酸胍以及在低温下的冷凝气体等处理的办法。只有两种方法能得到合理的产量。一种是反复冷冻和融化 60 次，继用盐析方法使蛋白质沉出。另一种是在 100°C 下用硫酸十二酯鈉 (Duponol C) 处理，然后再用盐析使蛋白质沉出。冷冻后继以融化的方法所生成的产物非常不均一，因此弃而不用。用硫酸十二酯鈉的方法所得的結果相当滿意。Dorner 和 Knight 认为 Bawden 和 Pirie[111] 所叙述的一种相似的、但采用低温的方法并不适用。在室温下加乙醇使溶液濃度达到 33% 可以使蕪菁黃化花叶病毒变性[91]。这是一个从中性冷溶液中制取核酸的方法。这种戊糖核酸在微碱性溶液中形成高度粘稠的溶液。这說明戊糖核酸是高度聚合的。

下面列举五种方法的詳細步驟。所用的方法主要决定于用作提取的組織的类型。

用盐酸胍从哺乳类动物的組織中提取戊糖核酸鈉[99]

从組織勻浆中提取戊糖核酸的方法包括：(1) 将脱氧戊糖核酸以核酸-蛋白质复合物的形式除去，(2)从 2M 盐酸胍冷溶液中使戊糖核酸沉出，而大量的蛋白质仍溶解在此溶液中，(3) 用氯仿-凝胶方法进一步提純戊糖核酸。

将新鮮冷冻的組織切成小片，以每克組織用 3 倍体积調整到 pH 6.8 的 0.15*M* 氯化鈉-0.02*M* 磷酸盐緩冲溶液与之混和，并在高速絞碎器中攪拌 6~8 分钟制成勻浆。同时加辛醇数滴以减少泡沫的生成。所成的勻浆放在离心机中在 3000 g 下轉离 30 分钟。此时实际上所有的脫氧戊糖核酸都以不溶解的核酸-蛋白质复合物形式除去。

在迅速攪拌下将固体盐酸胍加到上层清液中，使濃度变为 2*M*。所得的溶液在 38°C 下靜置 30 分钟，然后在 0°C 下冷却 1 小时。在这些条件下，組織提取液中大部分的蛋白质仍溶解在溶液中，同时有胶状沉淀生成，其中含有戊糖核酸和少量蛋白质。将沉淀用溶于 pH 6.8 的氯化鈉-磷酸盐緩冲液中的 2*M* 盐酸胍冷溶液洗滌两次。这样可除去存留在濃盐酸胍溶液中的任何脫氧戊糖核蛋白。将沉淀悬浮在 2*M* 盐酸胍溶液中（每克原組織用 1 体积），然后用氯仿-辛醇 (5:1) 按 Sevag、Lackman 和 Smolens 的方法[15]提取以除去蛋白质杂质。将悬浮在盐酸胍溶液中的核酸加到等体积的氯仿-辛醇混合液中，加热到 40°C，并用机械搖振 30 分钟，然后将其放在离心机中轉离。分出含有核酸的上层水溶液。再用新鮮的氯仿-辛醇混合液提取两次。

这些提取手續必須在 40°C 下进行，因为在冷却的情况下或在氯化鈉溶液中或水溶液中提取时，核酸和蛋白质的分离都不完全。用醋酸調节溶液的 pH 至 4.2~4.5 后再加两倍体积的冷乙醇就可以使核酸从冷的盐酸胍溶液中沉出。将沉出的白色絮状戊糖核酸在离心机中轉离，并用 70% 乙醇洗滌两次，然后再将此沉淀溶解在水中，小心用氫氧化鈉稀溶液調节 pH 至 6.8，再用轉离方法除去任何不溶解的变性蛋白质。为提純核酸，可以加 1 *M* 氯化鈉溶液使最后的氯化鈉濃度变为 0.05*M*，再加两体积乙醇使戊糖核酸鈉沉出。所得产物用 70% 乙醇洗滌两次。

另一个可以阻止任何核酸酶作用的方法是按每克組織以 3 倍体积的 2.5*M* 盐酸胍冷溶液与新鮮組織混和，并立即制成勻浆。以后的手續即按前述方法进行。所不同的仅戊糖核酸-蛋白质复合物至少要用 2*M* 盐酸胍冷溶液洗滌三次，以保証混杂在其中的脫氧戊糖核酸被完全除去。

Kay 和 Dounce[101] 批判了 Volkin 和 Carter[99] 的方法。因为在这个方法中虽然用盐酸胍分离了核酸和蛋白质，仍需再用氯仿-凝胶方法作进一步的提純。因此他們設計了下述方法，他們认为用这个方法可以得到不含有可檢出的蛋白质的高聚合度的戊糖核酸。

用硫酸十二酯鈉从哺乳类动物的組織中提取戊糖核酸鈉[101]

将 50 g 新鮮冷冻的組織切成小块，用 200 ml 含有 0.9% 氯化鈉和 0.1*M* 檸檬酸鈉的混合冷溶液将其混和，并在高速絞碎器（Waring 拌和器）中在 0～3°C 下攪拌 5 分钟制成匀浆。将匀浆放在离心机內在 0～3°C 下以 2500 轉/分的轉速轉离 30 分钟，以除去不溶解的脫氧戊糖核蛋白。傾出上层清液，再在冷却下以 2500 轉/分的轉速轉离，以便进一步除去任何剩余的脫氧戊糖核蛋白。将上层清液傾出，在冷却和攪拌下加入足量的 1*N* 盐酸，使溶液 pH 降至 4.5。所生成的濃厚沉淀在冷却下以 2500 轉/分的轉速轉离 15 分钟。弃去上层紅色清液。将沉降物与足量的 0.9% 氯化鈉溶液混和使总体积达到 100 ml。在攪拌下加入 9 ml 5% 純淨硫酸十二酯鈉的乙醇（45%）溶液。将 10% 氫氧化鈉溶液小心緩緩加到此混合液中以提高其 pH 到 7，然后继續攪拌 3 小时。再加入足量的固体氯化鈉使溶液的氯化鈉濃度变为 1*M*。将所成的略带粘稠的溶液在 Servall 离心机中以 14000 轉/分的轉速轉离 30 分钟。傾出上层清液，加入两倍体积的 95% 乙醇使核酸沉出。将生成的白色絮状沉淀在离心机中轉离，依次用乙醇和丙酮洗滌，并在空气中干燥。

将此干燥物质溶解于 100 ml 水中，在攪拌下加入 9 ml 硫酸十二酯鈉溶液，并在室温下攪拌 2 小时。加入足量的固体氯化鈉使溶液的氯化鈉濃度达到 1*M*。将此溶液以 14000 轉/分的轉速轉离 30 分钟。傾出上层清液，然后加入两倍体积的乙醇使核酸沉淀出来。将所形成的白色絮状沉淀在离心机中轉离，再依次用乙醇和丙酮洗滌，并在空气中干燥。

将上面所得白色粉末溶解在 30 ml 水中，并冷却到 0°C 左右。加入固体氯化鈉使溶液变为 0.9%。小心加入 0.1*N* 盐酸使 pH 降到 4.5。在冷却下将溶液以 14000 轉/分的轉速轉离 1 小时。傾上层清液于一燒杯中，杯中含足量的固体氯化鈉使溶液的最后氯化鈉濃度变成 1*M*。当氯化鈉已完全溶解而溶液仍冷时，小心加入 0.1*N* 氫氧化鈉溶液使 pH 提高到 7.0。加两倍体积的 95% 乙醇使核酸以鈉盐的形式沉淀出来。用离心方法收集白色絮状沉淀，然后依次用乙醇和丙酮洗滌，最后在空气中干燥。

最后所得的产物为白色粉末，容易溶解在水中生成澄清溶液。用此法从 50 g（湿重）鼠肝中所得的产物約为 200 mg（干重），相当于組織中戊糖核酸含量的 50%。

用苯酚从哺乳类动物的組織中提取戊糖核酸鈉[106]

将鼠肝和水放在高速絞碎器中攪拌 60 秒钟制成匀浆。所得匀浆用布氏

漏斗过滤以除去纤維状組織。在攪拌下迅速加入等体积的 90% 苯酚的水溶液(W/V)。继續攪拌 1 小时，然后在 0°C 下以 1750 轉/分的轉速轉离 1 小时。此时离心管中的液体分为两层。上层水溶液含全部的戊糖核酸和多糖，下层酚液含脫氧戊糖核酸和蛋白质。不溶解的蛋白质留在酚-水間的分界层处。将混浊水层吸出，酚层用水洗滌三次。合并水层，加醋酸鉀至溶液中，醋酸鉀的濃度为 2%，再加两倍体积的乙醇使戊糖核酸沉淀出来。将所生成的沉淀在离心机中以 1750 轉/分的轉速轉离 20 分钟，用乙醇-水(3:1)洗滌一次，然后将其溶解在 25~100 ml 水中。所含的乙醇可以在旋轉蒸发器中蒸发除去或用乙醚洗滌，然后用氮气流驅除水中剩余的乙醚。

将此澄清溶液与等体积的 2.5*M* 磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)，0.05 体积的 33.3% 磷酸和 1 体积的 2-甲氧基乙醇(重蒸餾过的)相混和。靜置或在离心机中轉离使下层液体連同任何不溶解的物质和上层分开。将下层液体用从 2-甲氧基乙醇-水-2.5*M* 磷酸氫二鉀-33.3% 磷酸 (按 1:1:1:0.05 体积比例)混和所成的上层液洗滌一次。合并的上层液体中含有所有的戊糖核酸。如遇有任何不溶解物质，可在用聚乙烯(Polythene)制成的离心管中以 10000g 轉离 1 小时。将上层清液合并，加甲苯数滴，并对水(2升)透析。透析时至少換水四次。必要时可将透析袋內的內容物在离心机中轉离。加醋酸鉀使醋酸鉀的濃度达到 2%，再加两倍体积的乙醇使戊糖核酸沉淀出来，并放在离心机中轉离以收集所生成的沉淀。用乙醇-水(3:1)洗滌 2~3 次，在眞空中用五氧化二磷干燥。产物含水約 12%。产量为 450~650 mg/100 g 鼠肝。

下面所述的是 Crestfield、Smith 和 Allen[102] 专为在提取过程中避免酶降解而設計的方法。他們认为提取所得的产物和其他样品有显著的差别，而且看来比它們优越。

从酵母中制取核糖核酸[102]

取一容量为 4 升的有盖燒杯，盖上有一狹縫，可插入一温度計和一机械攪拌器的攪棒。将 500 ml 含 2% 硫酸十二酯鈉、4.5% 乙醇、0.0125*M* 磷酸二氫鈉和 0.0125*M* 磷酸氫二鈉的混合液 (pH 6.5~6.7) 放在燒杯中，在攪拌下将溶液煮沸。移去杯盖，在不断攪拌下将 150 g 切成极小块的酵母加到此沸騰的溶液中，立即加盖以防止水分蒸发。在酵母加入后溶液的温度約为 83~87°C。继續加热和攪拌 1 分钟，然后将燒杯及其內容物移到沸水浴中放置 2 分钟以防止生成过多的泡沫。溶液在移到水浴中时，其温度为 92~94°C。在水浴中加热 2 分钟后，将燒杯內容物傾入一浸在干冰-溶纤剂 (Cel-

losolve) 冷冻混合剂中的2升燒杯中，用手攪拌4～8分钟，直到温度降低到約4°C时为止。将杯中混合物放在离心机中在0°C下以2000轉/分的轉速轉离30分钟。

在攪拌下将上层清液傾入两倍体积的冷乙醇中，并在冷却下在离心机中以2000轉/分的轉速轉离約15分钟，收集沉淀。沉淀用冷却的67%乙醇洗滌两次，每次用150 ml。在洗滌时，最好用玻棒将沉淀攪成勻浆，并緩緩加入洗液，同时加入2N氯化鈉溶液5～10滴以保証絮凝及回收。每次洗滌只需在2000轉/分的轉速下轉离15～20分钟。将所得粗制的核酸悬浮于80%乙醇中，并在冷却下靜置过夜以促成蛋白质的除尽。此粗制产物相当于酵母中所含的核糖核酸的80%以上。

将粗制的核酸用离心方法收集，然后溶解在130～180 ml水中。所成溶液呈混浊状态，其pH值約在8左右。立即小心加入1N醋酸将溶液中和到pH 7.0。在0°C下以20000轉/分的轉速轉离30分钟(Spinco L型制备用的离心机)使不再混浊。此时有些漂浮物质不能被除去。加固体氯化鈉于上层清液中使溶液氯化鈉的濃度变为1M。溶液在0°C下靜置时，混浊度仅微有增加，而粘度的增加則較显著。約在30分钟內有凝胶分离出来。将含有少量浮游杂质的黄色上层液以20000轉/分的轉速轉离1小时以分离凝胶。弃去上层清液。用67%乙醇将凝胶連續洗滌三次，每次用150 ml，其中加有1 ml 2M氯化鉀溶液。在連續攪拌下緩緩加水于洗后的沉淀使其溶解。这时溶液的pH值为7.0。在4°C下对經常更換的蒸餾水透析36小时。先用Celite过滤，然后用石棉垫过滤以除去混浊物。将澄清无色的溶液冷冻干燥以产生白色固体。产量1.4 g，相当于酵母中原有核糖核酸的60～70%。

下面是Dorner和Knight[110]所叙述的用以从番茄矮丛病毒(BS)、南方菜豆花叶病毒(SBM)和馬鈴薯病毒X (PX)中制取戊糖核酸的方法。

从植物病毒中制取戊糖核酸[110]

加硫酸十二酯鈉(Duponol C)溶液于病毒溶液中，使每ml反应混合物中分别含10 mg硫酸十二酯鈉和15 mg BS、16 mg硫酸十二酯鈉和7 mg SBM及2.5 mg硫酸十二酯鈉和1.5 mg PX。每种混合物以40 ml为一批，在离心管中用沸水浴加热4分钟，再在冰浴中冷却，然后对蒸餾水透析4.5小时。透析时换水数次。加适量的5M氯化鈉溶液于透析后的制备物中，使氯化鈉濃度达到1M，并在100°C下加热3分钟。在冰浴中冷却后，将沉出的蛋白

质放在离心机中轉离使其分出，并用热的 1*M* 氯化鈉溶液洗滌数次。合并上层清液和洗液，对蒸餾水透析 15～24 小时。透析时换水数次。对含有 SBM 和 PX 的反应混合物必須在濃縮到 30 ml 左右后用 1*M* 氯化鈉溶液使蛋白质再行沉淀一次，并透析 15～24 小时。在上面三种情况下所得的透析液均放在火棉胶袋內用吹风方法蒸发，使濃縮至 20～70 分之一。濃縮液以 40000 轉/分的轉速(Spinco L 型制备用离心机)轉离 1 小时。此时通常会得到变性蛋白质的小团块。将上层清液傾出，溶液进行冷冻干燥即可得到核酸。

Volkin 和 Carter[99] 用盐酸胍提取戊糖核酸的方法与 Kay 和 Dounce[101] 用硫酸十二酯鈉提取戊糖核酸的方法是唯一可資比較的两种方法。并沒有系統地研究过从这些方法提取所得产物的物理化学性质，但是鉴于用氯仿-凝胶方法以除去脱氧戊糖核酸中的蛋白质时所受到的分級作用[78]（当然这个方法也可以应用于戊糖核酸），則后一方法似乎更为可取。

（郑景略　譯）

参 考 文 献

[1] Miescher, F. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 441; *Die histochemischen und physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher* 2 vols: F. C. W. Vogel, Leipzig, 1897

[2] Altmann, R. *Arch. Anat. Physiol., Lpz.* 1889, p. 524

[3] Kossel, A. and Neumann, A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1894, **27**, p. 2215

[4] Neumann, A. *Arch. Anat. Physiol., Lpz.* 1899, Supplement, p. 552

[5] See for example:

Levene, P. A. *Hoppe-Seyl. Z.* 1905, **45**, p. 370; *J. biol. Chem.* 1921, **48**, p. 117; 1922, **53**, p. 441

Levene, P. A. and La Forge, F. B. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1910, **43**, p. 3164

Feulgen, R. *Hoppe-Seyl. Z.* 1914, **90**, p. 261

Johnson, T. B. and Brown, E. B. *J. biol. Chem.* 1922, **54**, p. 721

Baumann, E. J. *J. biol. Chem.* 1924, **61**, p. 1

Johnson, T. B. and Harkins, H. H. *J. Amer. chem. Soc.* 1929, **51**, p. 1779

Coghill, R. D. *J. biol. Chem.* 1931, **90**, p. 57

[6] Levene, P. A. and Bass, L. W. *Nucleic Acids*: Chemical Catalog Company, New York, 1931, p. 251

[7] Mirsky, A. E. and Pollister, A. W. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1942,

28, p. 344; *Genetics* 1943, **28**, p. 82; *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 1943, **5**, p.190; *Biol. Symp.* 1943, **10**, p. 247; *J. gen. Physiol.* 1946, **30**, p. 117

Pollister, A. W. and Mirsky, A. E. *Genetics* 1942, **27**, p. 150; *J. gen. Physiol.* 1946, **30**, p. 101

[8] Levene, P. A. and Jorpes, E. *J. biol. Chem.* 1930, **86**, p. 389

[9] Lilienfeld, L. *Z. physiol. Chem.* 1894, **18**, p. 473

[10] Hammarsten, O. *Z. physiol. Chem.* 1894, **19**, p. 19

[11] Wohlgemuth, J. *Hoppe-Seyl. Z.* 1903, **37**, p. 475

[12] Bang, I. *Beitr. chem. Physiol. Path.* 1903, **4**, pp. 115, 331 and 362

[13] Huiskamp, W. *Hoppe-Seyl. Z.* 1901, **32**, p. 145

[14] Jones, W. and Whipple, G. H. *Amer. J. Physiol.* 1902, **7**, p. 423

[15] Sevag, M. G., Lackman, D. B. and Smolens, J. *J. biol. Chem.* 1938, **124**, p. 425

[16] Kelley, E. G. *J. biol. Chem.* 1939, **127**, p. 55

[17] Seibert, F. B. and Watson, D. W. *J. biol. Chem.* 1941, **140**, p. 55

[18] Stern, K. G., Goldstein, G., Wagman, J. and Schryver, J. *Fed. Proc.* 1947, **6**, p. 296

[19] Stern, K. G. and Davis, S. *Fed. Proc.* 1946, **5**, p. 156

[20] Orgel, G. and Stern, K. G. *Fed. Proc.* 1950, **9**, p. 211

[21] Gajdusek, D. C. *Biochim. biophys. Acta* 1950, **5**, p. 397

[22] Stern, K. G., Goldstein, G. and Albaum, H. G. *J. biol. Chem.* 1951, **188**, p. 273

[23] Steiner, R. F. *Trans. Faraday Soc.* 1952, **48**, p. 1185

[24] Shooter, K. V., Davison, P. F. and Butler, J. A. V. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **13**, p. 192

[25] Butler, J. A. V., Davison, P. F., James, D. W. F. and Shooter, K. V. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **13**, p. 224

[26] Crampton, C. F., Lipshitz, R. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1954, **206**, p. 499

[27] Doty, P. and Zubay, G. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 6207

[28] Dounce, A. L. and O'Connell, M. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 2013

[29] Clarke, G. and Schryver, S. B. *Biochem. J.* 1917, **11**, p. 319

[30] Cardin A. and Pinotti O. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 1936, **11**, p. 752

[31] Thompson, R. H. S. and Dubois, R. J. *J. biol. Chem.* 1938, **125**, p. 65

[32] Watanabe, I. and Suzuki, K. *J. chem. Soc. Japan* (pure chemistry section) 1951, **72**, pp. 578, 580 and 604; *Chem. Abstr.* 1952, **46**, p. 3666

[33] von Euler, H. and Hahn, L. *Arkiv. Kemi Min. Geol.* 1946, **22A**, No. 17; 1946, **23A**, No. 5

[34] Petermann, M. L. and Lamb, C. M. *J. biol. Chem.* 1948, **176**, p. 685

[35] Gulland, J. M., Jordan, D. O. and Threlfall, C. J. *J. chem. Soc.* 1947, p. 1129
[36] Frick, G. *Biochim. biophys. Acta* 1949, **3**, p. 103
[37] Fleming, M. and Jordan, D. O. *Disc. Faraday Soc.* 1953, No. 13, p. 217
[38] Ambrose, E. J. and Butler, J. A. V. *Disc. Faraday Soc.* 1953, No. 13, p. 261
[39] Luck, J. M., Kupke, D. W., Rhein, A. and Hurd, M. *J. biol. Chem.* 1953, **205**, p. 235
[40] Hammarsten, E. *Biochem. Z.* 1924, **144**, p. 383
[41] Cohen, S. S. *J. biol. Chem.* 1945, **158**, p. 255
[42] Bernstein, M. H. and Mazia, D. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **11**, p. 59
[43] Chargaff, E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 323
[44] Felix, K. and Hartenech, A. *Hoppe-Seyl. Z.* 1926, **157**, p. 26
[45] Maver, M. E. and Greco, A. E. *J. biol. Chem.* 1949, **181**, p. 8
[46] Fenstein, R. N. and Butler, C. L. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* 1951, **79**, p. 179
[47] Davison, P. F., Conway, B. E.and Butler, J. A. V. *Progr. Biophys.* 1954, **4**, p. 148
[48] Chargaff, E. and Saidel, H. F. *J. biol. Chem.* 1949, **177**, p. 417
[49] Dounce, A. L. and Monty, K. J. *J. biophys. biochem. Cytol.* 1955, **1**, p. 155
Monty, K. J. and Dounce, A. L. *J. gen. Physiol.* 1958, **41**, p. 595
[50] Mirsky, A. E. and Ris, H. *J. gen. Physiol.* 1947, **31**, p. 7; 1951, **34**, p. 475
[51] Peacocke, A. R. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 157
[52] Thomas, R. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1953, **35**, p. 609; *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 231
[53] Chargaff, E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 322
[54] Signer, R. and Schwander, H. *Helv. chim. acta* 1949, **32**, p. 853
Schwander, H. and Signer, R. *Helv. chim. acta* 1950, **33**, p. 1521
[55] Sevag, M. G. *Biochem. Z.* 1934, **273**, p. 419
[56] Sreenivasaya, M. and Pirie, N. W. *Biochem. J.* 1938, **32**, p. 1707
[57] Bawden, F. C. and Pirie, N. W. *Biochem. J.* 1940, **34**, p. 1278
[58] Marko, A. M. and Butler, G. C. *J. biol. Chem.* 1951, **190**, p. 165
[59] Dounce, A. L., Simmons, N. S. and Kay, E. R. M. *Fed. Proc.* 1951, **10**, p. 177
[60] Kay, E. R. M., Simmons, N. S. and Dounce, A. L. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 1724
[61] Simmons, N. S., Chavos, S. and Orbach, H. K. *Fed. Proc.* 1952, **11**, p.390

[62] Chargaff, E., Lipshitz, R.and Green, C. *J. biol. Chem.* 1952, **195**, p. 155
[63] Butler, J. A. V., Conway, B. E. and James, D. W. F. *Trans. Faraday Soc.* 1954, **50**, p. 612
[64] Chargaff, E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 324
[65] Cosgrove, D. J. and Jordan, D. O.—unpublished results
[66] McCarty, M. and Avery, O. T. *J. exp. Med.* 1946, **83**, pp. 89 and **97**
[67] Zamenhof, S., Leidy, G., Alexander, H. E., Fitz Gerald, P. L. and Chargaff, E. *Arch. Biochem. Biophys.* 1952, **40**, p. 50
[68] Zamenhof, S., Alexander, H. E. and Leidy, G. *J. exp. Med.* 1953, **98**, p. 373
[69] See for example:
Gandelman, B., Zamenhof, S. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **9**, p. 399
Chargaff, E., Zamenhof, S., Brawerman, G. and Kerin, L. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 3825
Zamenhof, S., Brawerman, G. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **9**, p. 402
Snellman, O. and Widström, G. *Arkiv. Kemi Min. Geol.* 1945, **19A**, No. 31
[70] Jones, A. S. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **10**, p. 607
[71] Chargaff, E. and Zamenhof, S. *J. biol. Chem.* 1948, **173**, p. 327
[72] Brown, G. L. and Martin, A. V. *Nature, Lond.* 1955, **176**, p. 971
[73] Zamenhof, S., Shettles, L. B. and Chargaff, E. *Nature, Lond.* 1950, **165**, p. 756
[74] Wyatt, G. R. *Biochem. J.* 1951, **48**, p. 584
Mann, T. *The Biochemistry and Fertilization of the Gametes* (Biochem. Soc. Symposia No. 7): Cambridge University Press, London, 1951, p. 11
[75] Frick, G. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **13**, p. 374
[76] Doty, P. and Bunce, B. H. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 5029
[77] Reichmann, M. E., Rice, S. A., Thomas, C. A. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, p. 3047
[78] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 705
[79] Vendrely, R., Vendrely, C. and Sadron, C. *C. R. Acad. Sci., Paris* 1957, **244**, p. 676
[80] Laland, S. G., Overend, W. G. and Webb, M. *J. chem. Soc.* 1952, p. 3224
[81] McCarty, M. and Avery, O. T. *J. exp. Med.* 1946, **83**, p. 97
[82] Chargaff, E., Zamenhof, S., Brawerman, G. and Kerin, L. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 3825

[83] Zamenhof, S. and Chargaff, E. *Nature, Lond.* 1951, **168**, p. 604
[84] Dutta, S. K., Jones, A. S. and Stacey, M. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **10**, p. 613
[85] See Levene, P. A. and Bass, L. W. *Nucleic Acids*: Chemical Catalog Company, New York, 1931, p. 299
[86] Schneider, W. C. *J. biol. Chem.* 1946, **165**, p. 585
[87] Mirsky, A. E. and Pollister, A. W. *J. gen. Physiol.* 1946, **30**, p. 117
[88] Kerr, S. E. and Seraidarian, K.*J. biol. Chem.* 1949, **180**, p. 1203
[89] Stanley, W. M. *Science* 1935, **81**, p. 644
[90] Hamoir, G. *Biochem. J.* 1951, **48**, p. 146
[91] Markham, R. and Smith, K. M. *Parasitology* 1949, **39**, p. 330
[92] Hogeboom, G. H. and Schneider, W. C. *The Nucleic Acids* Vol. 2 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 205
[93] Knight, C. A. and Stanley, W. M. *J. biol. Chem.* 1941 **141**, p.29
[94] Knight, C. A. *J. biol. Chem.* 1947, **171**, p. 297
[95] Knight, C. A. *J. biol. Chem.* 1952, **197**, p. 241
[96] Bacher, J. E. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1950, **183**, p. 641
[97] Davidson, J. N. and Waymouth, C. *Biochem. J.* 1944, **38**, p. 375
[98] Chargaff, E., Magasanik, B., Vischer, E., Green, C., Doniger, R. and Elson, D. *J. biol. Chem.* 1950, **186**, p. 51
[99] Volkin, E. and Carter, C. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1516
[100] Grinnan, E. L. and Mosher, W. A. *J. biol. Chem.* 1951, **191**, p. 719
[101] Kay, E. R. M. and Dounce, A. L. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 4041
[102] Crestfield, A. M., Smith, K. C. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1955, **216**, p. 185
[103] Davis, F. F. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1957, **227**, p. 907
[104] Gierer, A. and Schramm, G. *Nature, Lond.* 1956, **177**, p. 702
[105] Gierer, A. and Schramm, G. *Z. Nature,* 1956, **11b**, p. 138
[106] Kirby, K. S. *Biochem. J.* 1956, **64**, p. 405
[107] Cotter, J. S. and Brown, R. A. *Science* 1956, **124**, p. 1077
[108] Schuster, H., Schramm, G. and Zillig, W. *Z. Nature,* 1956, **11b**, p. 339
[109] Cohen, S. S. and Stanley, W. M. *J. biol. Chem.* 1942, **144**, p. 589
[110] Dorner, R. W. and Knight, C. A. *J. biol. Chem.* 1953, **205**, p. 959
[111] Bawden, F. C. and Pirie, N. W. *Biochem. J.* 1940, **34**, p. 1258

第三章　核酸的不均一性和分級分离

引　言

任何細胞的整个遺傳补体中都有很多遺傳因素。若使基因的活性部分与脫氧戊糖核酸間的同一性是正确的話，那么就必須假定細胞的全部脫氧戊糖核酸含有許多具有专一遺傳功能和特异化学結构的不同分子，或是含有少数大分子，沿着它們的鏈具有一些特殊結构，而每一个这样的結构形成一个具有特殊遺傳功能的区域[1]。究竟这两者之間，何者更符合事实，我們还不知道。也許是这两种方式均用于形成遺傳密碼。但是不論用何种方式，从一个細胞中分离出来的全部脫氧戊糖核酸几乎无疑地存在着化学的与物理的不均一性。

在戊糖核酸中也能預料到不均一性。目前已积累了大量的証据，表明戊糖核酸与蛋白质的合成有着紧密的联系。假使这样的关系的确是存在的話，那么单一細胞合成多种蛋白质的已知事实必然表明細胞中的戊糖核酸具有不均一性。因此，和脫氧戊糖核酸一样，从一个細胞中提取出来的全部戊糖核酸也很可能表現着物理的和化学的不均一性。用化学或物理方法将核酸样品进行分級分离，現在必須看作是任何詳尽研究核酸結构的初步工作；显然这种分級分离必須先于任何企图去确定多核苷酸鏈中的核苷酸次序。

到目前为止已进行的不均一性和分級分离的大部分研究工作是与脫氧戊糖核酸有关，而与戊糖核酸无关。这反映出目前的看法，即細胞內的遺傳功能是受細胞核的脫氧戊糖核酸所控制，而細胞质內的戊糖核酸的作用則比較不明显。并且，脫氧戊糖核酸的滿意的和可靠的制备方法較之戊糖核酸的制备方法則更早有所认識。

脫氧戊糖核酸的物理不均一性

虽然仅在最近才得到直接的定量論据，但是溶液中的脫氧戊糖核酸盐离子的不均一分散性质早就意料到。只有用 Schlieren (Philpott-Svensson) 光学系統，才能研究濃度低至 5×10^{-4} g/ml 的核酸的沉降作用。在这个濃度范圍內，可以得到一个經常在多聚电解质溶液中所观察到的超清晰 (hypersharp) 的 Schlieren 界区。虽然生成超清晰的 Schlieren 界区的原因尙不清楚，但毫无疑問，这个界区的形状与核酸样品的沉降系数的分布无关。

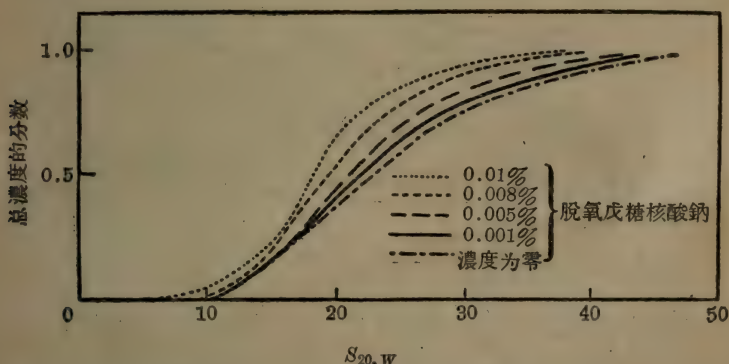


图 1 在 0.2M 氯化鈉溶液中不同濃度脫氧戊糖核酸鈉的沉降系数分布曲綫
(K. V. Shooter 和 J. A. V. Butler: *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, 739 頁)

应用紫外吸收的光学系統，核酸溶液在紫外区域所显示的强烈吸收可以加以利用，因而在溶液濃度低至 10^{-5} g/ml 时的不同濃度的沉降系数可加以測定。利用这个方法，Shooter 和 Butler[2,3] 从紫外吸收的改变，測定了越过沉降界区的脫氧戊糖核酸鈉溶液的沉降系数的分布，并由此測定了核酸盐的濃度。图 1 表示随着核酸盐濃度所发生的沉降系数分布的变化情况。图中曲綫闡明，具有低沉降系数值的物质其沉降系数对濃度的依賴关系小，但具

有更高沉降系数值的物质則其沉降系数对濃度的依賴关系大。但是，重要的关系是在濃度为零时（按 Oth 和 Desreux[4] 的方法計算），此时显示出沉降系数分布的实况。

脫氧戊糖核酸与其母体核蛋白的沉降系数分布[5]的比較表明当应用阴离子型去污剂法以提取核酸时（Kay、Simmons 和 Dounce 法，参看第二章，参考文献 60），在去除蛋白质过程中，沉降系数分布沒有改变，分級也沒有发生。但是，用氯仿-凝胶法以去除蛋白质时（Sevag、Lackman 和 Smolens 法，参看第二章，参考文献 15），則产生一种核酸，它具有一个显然不同于原来的核蛋白的沉降系数分布曲綫。这表明在去除蛋白质过程中，脫氧戊糖核酸的分級已經发生（图 2）。

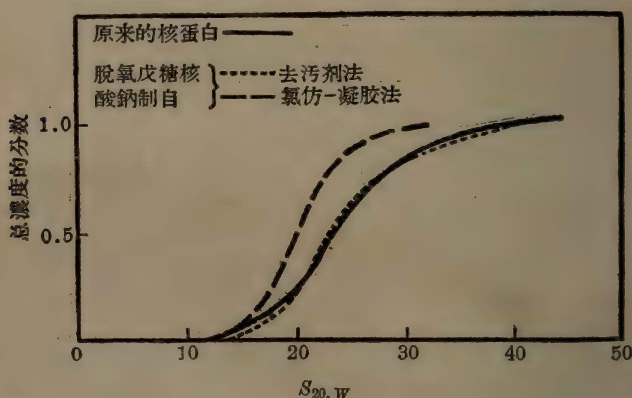


图 2 不同方法制备的脫氧戊糖核酸鈉和核蛋白的沉降系数分布曲綫
（K. V. Shooter 和 J. A. V. Butler: *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, 707 頁）

从脫氧戊糖核酸鈉溶液中用沉降方法所观察到的这样明显的不均一性使人有些惊奇，因为鉴于对一个具有恒定截面（constant cross-section）的坚实棒状系統来讲，沉降系数应該与棒的长度几乎无关[7,8]。从 Shooter 和 Butler 观察到的显著不均一性令人推测：可能由于聚集的作用，脫氧戊糖核酸盐离子若使不是揉曲到某种程度，就是它們的直徑是可变的。为了要清楚地証明所观察到

的不均一性并不是由于聚集作用所引起，Shooter 和 Butler[6] 曾将脫氧戊糖核酸盐放在搧开式具套管的轉头(swing bucket rotor)中在 Spinco E 型超速离心机中以 39000 轉/分的轉速轉离 4.5 小时加以分級分离,并使沉降继續进行至溶液濃度由最初的 7×10^{-5} g/ml 变为 1×10^{-5} g/ml。具有沉降系数大于 20 的所有物质都被沉降到管的底部。在靜置后，从沉降的測定并沒有发現这个溶液中有聚集作用。这个級分的沉降系数分布与原来的脫氧戊糖核酸盐沉降系数分布的比較見图 3。虽然这个級分仍有一个一定的沉降系数范圍,但已明显地比原来的物质的为小。

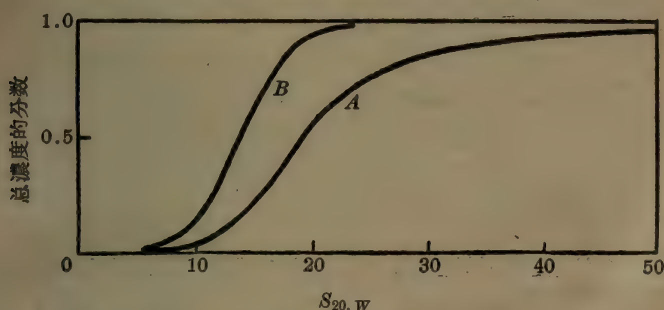


图 3 脫氧戊糖核酸鈉的沉降系数分布曲綫,表示延长离心后所得的分級分离
A. 原来的溶液； *B*. 离心后所得到的級分
(K. V. Shooter 和 J. A. V. Butler: *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, 706 頁)

脫氧戊糖核酸的化学不均一性和分級分离

在試图将脫氧戊糖核酸分成具有不同遺傳活性的級分时許多不同的方法曾被采用过。最早认为脫氧戊糖核酸可以分級分离的意見大概是由 Mirsky 和 Ris[9] 提出的。他們观察到当提取出来的染色体的大部分脫氧戊糖核酸溶解于 1 *M* 氯化鈉溶液中时，少量的核酸仍可以从不溶于这个溶液的殘余染色体中檢出。这部分殘余核酸最初被认为是一种杂质，但也完全可能基于脫氧戊糖核酸在 1 *M* 氯化鈉中的不同溶解度而发生了分級分离。上述的可

能性也适用于一个简单的报道[10]所述的肝細胞核中的脫氧戊糖核酸只是部分地溶解在蔗糖的濃溶液中。

Bendich[11] 与 Bendich、Russell 和 Brown[12] 是第一个眞正試图利用两个級分在 0.87% 氯化鈉溶液中的不同溶解度将脫氧戊糖核酸分級分离。从不同組織提取出来的核酸可以观察到其可溶部分与不溶部分的比例有显著的差別；从任何一个組織中提取出来的这两个級分，在摻入事先給与的 C^{14} 到各嘌呤碱和嘧啶碱中的程度是不相同的。

Chargaff、Crampton 和 Lipshitz[13] 从分离七个級分的結果，介紹了一个比較詳尽的步驟。他們从小牛胸腺中提取出核蛋白后，在高速混和器中将核蛋白水溶液用氯仿-正辛醇混和液处理，使其成凝胶析出，然后将凝胶逐步用濃度递增的氯化鈉溶液提取，再用乙醇使核蛋白沉出，而脫氧戊糖核酸則用氯仿-凝胶法提取。提取出的級分均进行了分析研究。所得的最重要的观察为：用濃度递增的氯化鈉溶液提取时則得到一系列含有鳥嘌呤和胞嘧啶濃度递降而腺嘌呤和胸腺嘧啶濃度递升的核酸級分。但是，各对碱基仍以等克分子的比例存在于各級分中。这种分級分离方法可能是以核酸与蛋白质間鍵的稳定性的差別为根据的，而上述这些作者[14]在作更广泛的研究时，曾用人造蛋白质-核酸盐为对象，并把这种研究推广到不同組織的脫氧戊糖核酸的研究中去。

Lucy 和 Butler[15] 重复了 Chargaff、Crampton 和 Lipshitz 的工作。当他們一般地确定了分級分离的方法时，他們的工作結果表明在用氯化鈉溶液作凝胶的提取中，主要的可变因素不是氯化鈉的濃度，因为类似的分級分离也可以将凝胶用同濃度的氯化鈉溶液反复提取而得到完成。

利用在碱液中的不同溶解度，从細菌細胞中作脫氧戊糖核酸的分級分离也曾被尝試过[16]。从細菌細胞中曾得到两个級分，其一在 37°C 下易溶在 1 M 氫氧化鈉溶液中，而另一則在相同条件下依然牢固地与多糖相結合。从这两个級分的分析結果証明它們的嘌呤和嘧啶的成分沒有差別。

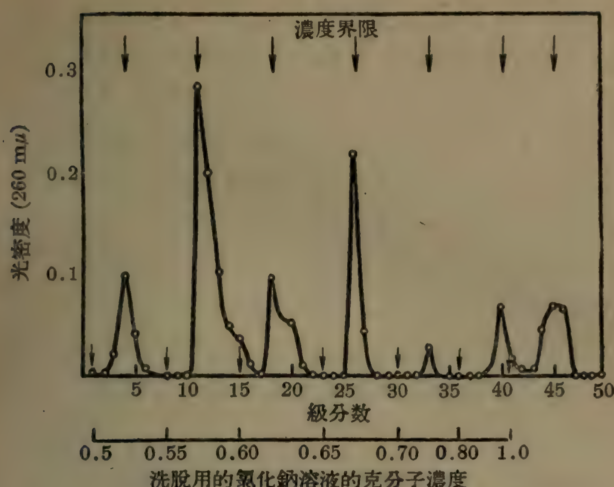


图 4 从組蛋白包裹的硅藻土柱上用氯化鈉溶液作小牛胸腺脫氧核糖核酸的不連續洗脫

(G. L. Brown 和 M. Watson: *Nature, Lond.* 1953, **172**, 340 頁)

分級分离的一个重要进展是用层析法进行核酸分級分离的尝試。鉴于核酸对碱性蛋白质具有亲和力以及核酸分子間在化学結构上的差別有可能影响到它們与蛋白质間結合的鍵的强度，Brown 和 Watson[17] 应用了层析柱，在柱內将从小牛胸腺制备的組蛋白固定在硅藻土表面上。将这个組蛋白包裹的硅藻土分散在 0.4 M 氯化鈉溶液中，然后将一些适当濃度的脫氧核糖核酸(小牛胸腺)溶液从层析柱的頂部加入。在压力下这些溶液冲洗入柱內，于是核酸則被吸附在柱上。然后将吸附的核酸用逐段递增或連續递增濃度的較濃的氯化鈉溶液加以洗脫。图 4 是一个典型的逐段洗脫图譜。这个图譜明显地表示出随着每一氯化鈉溶液濃度的增加，一个肯定的脫氧核糖核酸級分被清楚地洗脫下来，这个級分在前后两个洗脫液之間的濃度分界处。因此对于核酸与碱性蛋白质互相結合的盐鍵的强度来讲，証明了这个制备物是不均一的。級分分析指出在核酸級分中腺嘌呤与鳥嘌呤的比例和胸腺嘧啶与胞嘧啶的比例是随着氯化鈉洗脫液濃度的增大而递增的。这样就

証实了 Chargaff、Crampton 和 Lipshitz[13] 过去工作的結果。Brown 和 Watson 更能証明不同来源的核酸具有显著不同的洗脫图譜。Brown 和 Martin[18] 采用了按 Hoffpauir 和 Guthrie[19] 方法制备的磷酰化纤維素柱代替作为組蛋白支持物的硅藻土，在此柱上将受热变性并继之以重氮化[20]后的組蛋白进行分級分离，其中有一个选擇的級分就会附着在这种纤維柱上。使用这种纤維柱，噬菌体的脫氧戊糖核酸曾被分成两个清楚的級分[18,21]。不管制备噬菌体核酸的方法如何，都可进行这种分級分离，而这两个級分中的腺嘌呤与鳥嘌呤的比值完全不同。Lerman[22] 应用了类似以上的层析法曾将肺炎球菌中的遺傳轉移物质进行分級分离。

Main 和 Cole[24] 及 Semenza[25] 应用了曾經滿意地用于层析蛋白质[23]和酶的磷酸鈣凝胶对脫氧戊糖核酸进行分級分离。这种层析柱的制备已由 Tiselius 及其同工者叙述过[23,26]。他們将在磷酸盐緩冲液中的核酸溶液逐段洗脫[25]或用連續式梯度洗脫法加以洗脫。Semenza 曾經观察到三个可以重复分級分离的洗脫峰，但是 Main 和 Cole 沒有得到多于一个的洗脫峰，并且也沒有观察到有明显的分級。

发展到現在为止，Bendich 及其同工者[1,27~31]的分級分离技术可算是最令人滿意的。由于脫氧戊糖核酸含有可电离的磷酸基团并能成为带有一个凈負电荷(等电点低于 pH 1)的离子，因此他們将核酸当作一个多聚阴离子的混合物来处理，因而采用了阴离子交換层析法。但是选擇一个适宜的交換剂是不易的，他們在得到一个滿意的分級分离之前曾經試用过几种交換剂[31]。已知对分級分离核苷酸(参看第四章)有效的强碱型树脂，Dowex-1，对于脫氧戊糖核酸則表現着低的吸收容量，并且吸入到这种树脂中的那一級分的核酸由于結合得如此微弱，以致不能用于层析。应用弱碱型树脂 Amberlite IR4B 曾經得到比較滿意的結果。用离子强度遞增的氯化鈉溶液作为洗脫液可使大量吸入柱中的核酸从这个交換剂成为許多洗脫級分而获得回收(在不同試驗中，曾观察到

有16～200个洗脱峰)。但是，Amberlite树脂在其他方面的应用则不太理想，因为所得到的結果不能重复，而且有大量的树脂杂质掺入到洗脱液中。

用某些含氮纤維素衍生物作为交换剂曾获得令人鼓舞的結果。这些交换剂是由Peterson和Sober[32~35]为了蛋白质和肽的分級分离而发展起来的。在各种被試过的交换剂中，对核酸分級分离最有希望的是由Peterson和Sober称之为ECTEOLA-SF的纤維素。这种交换剂虽然对蛋白质和肽的层析沒有多大用处，但用于脱氧戊糖核酸的分級分离則非常满意[1,27~31,36,37]。ECTEOLA-SF交换剂是从高純度的木纤維素(Peterson和Sober以及Bendich及其同工者使用的是一种称为Solka-Floc的制备物)用三羥乙胺和氯甲基一氧三圜(epichlorohydrin)按下述方法处理而制成的。

将150 ml含有60 g氫氧化鈉的溶液在攪拌下加到60 g Solka-Floc中，并在冰中冷却30分钟，然后将35 ml三羥乙胺和60 ml氯甲基一氧三圜的混和物分几部分加入其中。在充分混和后，将混和物在油浴中于75～80°C間加热30分钟，并不时加以攪拌。浸入油浴約10分钟后，发生放热反应，并有蒸气急遽逸出。在加热时間終止时，将所成的琥珀色胶状物在冰浴中冷却，并将250 ml 2 *M* 氯化鈉溶液在攪拌下分几部分加入其中，使成一匀和的悬浮液。产物过滤后，用乙醇洗滌三次，并在眞空中干燥。

这样制成的交换剂在0.5 *M* 氯化鈉溶液中的碱度(pK'_a)为7.5，而且非常可能含有含氮的交联(cross-linkages)。若小心遵守合成步驟[34]，交换剂的制备是可以合理地加以重复的[31]。具有不同吸附特性的交换剂可以从不同比例的三羥乙胺和氯甲基一氧三圜制成。

Bendich、Pahl、Korngold、Rosenkranz和Fresco[31]曾詳細报道了ECTEOLA-SF对脱氧戊糖核酸、寡核苷酸和核苷酸的吸附性质。这种交换剂对脱氧戊糖核酸的吸附量約为用上述方法制备的交换剂的8～10 mg/g，可是它对单核苷酸的吸附量則甚低。但是用結晶胰脱氧核糖核酸酶将小牛胸腺脱氧核糖核酸消化而制

成的寡核苷酸混合物則被很好地吸附，以致能获得一个滿意的分級分离。

ECTEOLA 柱最好是制备在一个 2×10 cm 的管中，管底熔接一粗孔隙的熔結 Pyrex 玻璃漏斗(內徑 0.8 cm，高 12 cm)，而管頂則熔接一标准的磨砂口玻璃座 (glass socket)。将 0.5 g ECTEOLA 和約 20 ml pH 7.0 的 0.01 M 磷酸盐緩冲液制成稀浆注入柱內。稀浆的流速用一螺旋夹和附于柱底的橡皮管加以控制。然后用 0.5 N 氫氧化鈉溶液以每小时約 5～10 ml 的流速洗滌交換剂，直到流出液在 260 mμ 处显示出一个可忽視的光密度值(小于 0.015)时为止。过多的洗滌似乎对交換剂无害，因此常推荐用碱液延續洗滌 3 至 4 天。在碱液洗滌后，继續用 pH 7.0 的 0.01 M 磷酸盐緩冲液以同样的流速洗滌 3 至 4 天。然后将每毫升含有 1 g 脫氧戊糖核酸的 pH 7.0 的磷酸緩冲液或 0.001 M 氯化鈉溶液加到交換剂中。将此溶液，1～3 ml，用吸管徐徐加至刚洗过的交換剂上面的溶液中。在重力下，让溶液以每小时不超过 2～4 ml 的速度从交換剂濾过。当柱上的溶液全部流过而只剩下 0.5 ml 时，柱壁用数毫升的磷酸盐緩冲液或氯化鈉溶液洗滌，使液流継續进行，直至交換剂上留有 0.5 ml 时为止。此时已有数百毫升的磷酸盐緩冲液以每小时 3 ml 的速度通过交換剂(已載积有核酸)，直至流出液的光密度值又小于 0.015 时为止。此时核酸被牢固地附着在交換剂上，虽用磷酸盐緩冲液充分洗滌亦不能把它除去。

ECTEOLA-核酸柱的洗脫可用間断洗脫法或梯度洗脫法加以完成。在前一个方法中氯化鈉的濃度是从 0.05 M 到 0.1、0.2 等等逐步增高，直到 2 M 时为止，流速維持在每小时 5～6 ml。然后測定最大吸收区域(从 240～290 mμ) 中洗脫液的紫外吸收率，并且继續用一定濃度的氯化鈉溶液进行洗脫，直到能从洗脫液中得到一个恒定的低光密度值时为止。

Bendich、Fresco、Rosenkranz 和 Beiser[27] 曾得到一个小牛胸腺脫氧核糖核酸的层析譜外形图(图 5)，这个外形图显示出在 0.2 和 0.4 M 氯化鈉間有两大級分。(层析譜外形图是将在 260 mμ 处的光密度值乘以級分的毫升数所得的积对管数及洗脫液濃度作图而得到的。)

一般来讲，梯度洗脫法是一个比較滿意的技术，可是 Bendich、Fresco、Rosenkranz 和 Beiser[27] 在采用单混和室的梯度洗脫系統时就不能将图 5 中所示的那两个大級分分开。但是，当使用了

双混和室系統时，却能得到更好的分开。使用双混和室系統的目的是使濃度的范圍极緩地上升。这种如 Bendich、Pahl、Korngold、Rosenkranz 和 Fresco[31] 所描述的系統見图 6。

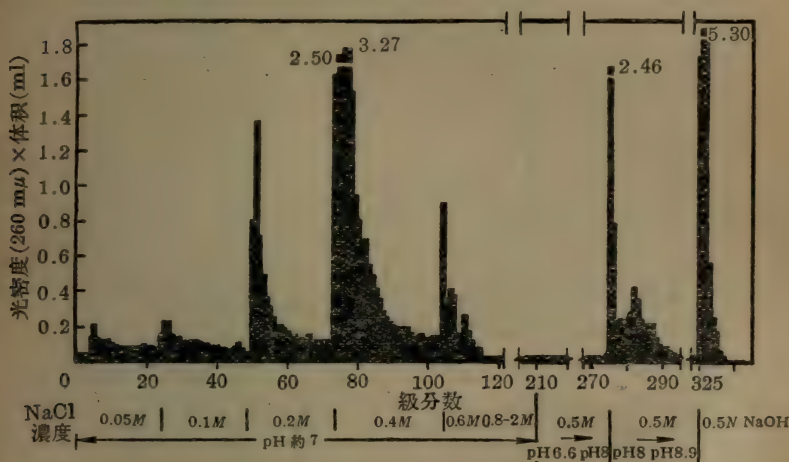


图 5 ECTEOLA-纤維柱上小牛胸腺脱氧核糖核酸的不連續洗脫
(3.6 mg 脱氧核糖核酸在 0.5 克 ECTEOLA-纤維素上)
(A. Bendich, J. R. Fresco, H. S. Rosenkranz 和 S. M. Beiser: *J. Amer. Chem. Soc.* 1955, **77**, 3672 頁)

将濃度为 0.5 *M* 的氯化鈉溶液和調节至 pH 7 的 0.01 *M* 磷酸盐緩冲液配制成的母液盛于分液漏斗中，然后滴入裝在 150-ml 錐形瓶中的 100～125 ml 磷酸盐緩冲液中，同时用磁力攪拌器攪拌。让这个溶液流至含有与第一混和室內同量的磷酸盐緩冲液的第二混和室內，此室內的溶液亦用磁力攪拌器攪拌。当一定量容积的流出液通过后，对洗脫液的任何微小增加量，其氯化鈉濃度均可从下式求得[31]：

$$[\mathrm{NaCl}]_{\text{流出液}} = [\mathrm{NaCl}]_{\text{儲备液}} - [\mathrm{NaCl}]_{\text{儲备液}} \frac{V+1}{e^{V}}$$

式中
$$V = \frac{\text{通过的累积容量}}{\text{混和室中的容量}}$$

上式仅在全部操作中混和室內的容量維持不变时才能生效。采用內徑 2 mm 的厚壁长毛細管（4～5 cm）可避免容量的改变。洗脫液的流速为每小时 2～5 ml，每隔 2 小时将其收集在自动級分收集器中。

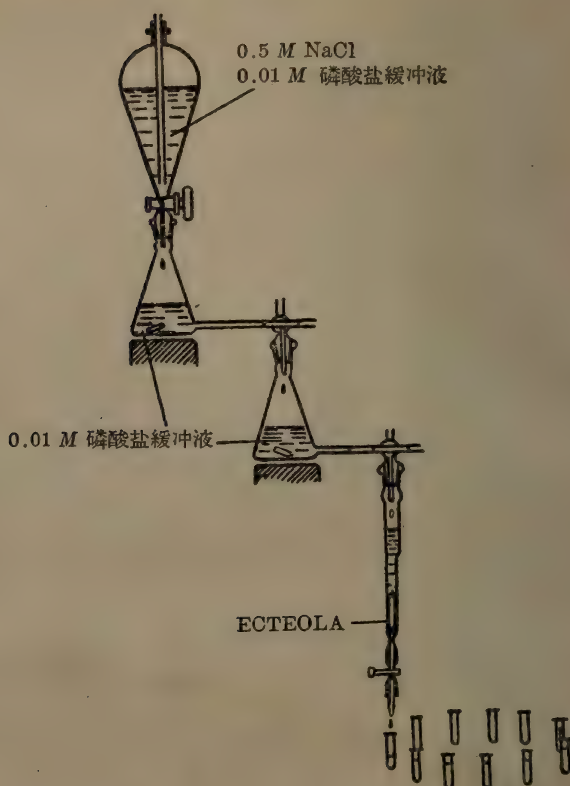


图 6 具有双混和室的用作梯度洗脱法的装置

(A. Bendich, H. B. Pahl, G. C. Korngold, H. S. Rosenkranz 和 J. R. Fresco: *J. Amer. Chem. Soc.* 1958, **80**, 3952 頁)

当 0.5 *M* 氯化鈉的极限濃度到达后，若使氯化鈉的濃度提高到 2.0 *M*，則从小牛胸腺脱氧核糖核酸的洗脱液中仅有极少量附加的核酸被洗脱下来。若使用氫氧化銨溶液使 pH 值增加，亦只能洗脱出分量略多的核酸。但是，若使将氯化鈉的濃度和 pH 值同时提高，則有大部分的核酸釋出。按照这个方法，层析可以在氯化鈉的濃度从 0.5 *M* 提高到 2.0 *M* 而 pH 从 7.0 提高到 11.0 的情况下继續进行。若将层析柱最后用 0.5 *N* 氫氧化鈉溶液洗滌，則可以回收到几乎全部的核酸[31]。

层析譜外形的可再現程度見图 7。此图是从部分肝切除术 2

周和4周后的鼠肝細胞核用阴离子型去污剂法提取出来的脱氧戊糖核酸的独立层析譜。图7中的大部分的洗脱峰基本上是重迭的。它們的分开只有在每小时流速不超过3至5 ml 时才能获得。洗脱速度的些微增加将导致分开能力的下降。

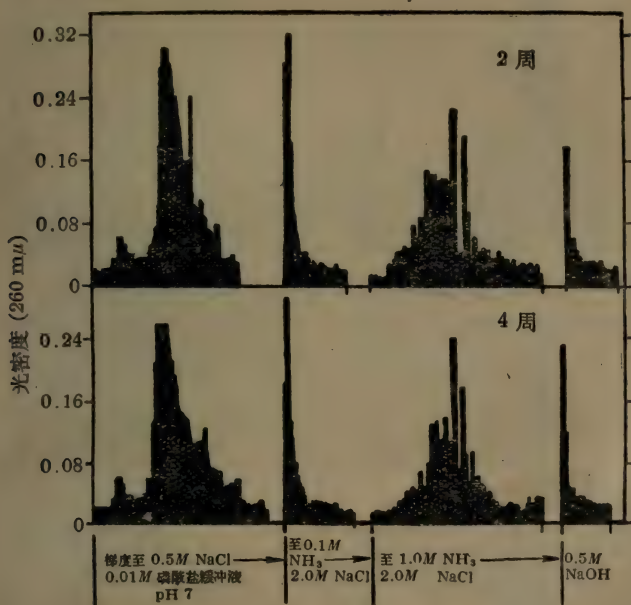


图7 經部分肝切除术2周和4周后的再生鼠肝脱氧戊糖核酸在 ECTEOLA 柱上的层析

(A. Bendich, H. B. Pahl, G. C. Korngold, H. S. Rosenkranz 和 J. R. Fresco: *J. Amer. Chem. Soc.* 1958, **80**, 3954 頁)

不同来源的脱氧戊糖核酸的层析譜不同。每一来源的核酸表現其特有的典型层析譜。Bendich、Pahl 和 Beiser[28] 已能对下列来源的脱氧戊糖核酸的层析譜加以区别：小牛胸腺，人类白血病的白血球，大腸杆菌，*B. cereus*，肺炎球菌，T6r 噬菌体，T6r+噬菌体以及大鼠的脾、腸、腎和脑。用上述方法也曾对它們的制备方法作过比較[28]。图8表示出人体粒細胞的脱氧戊糖核酸的两个样品的层析譜。其中一个样品是用阴离子型去污剂法制得的，而另

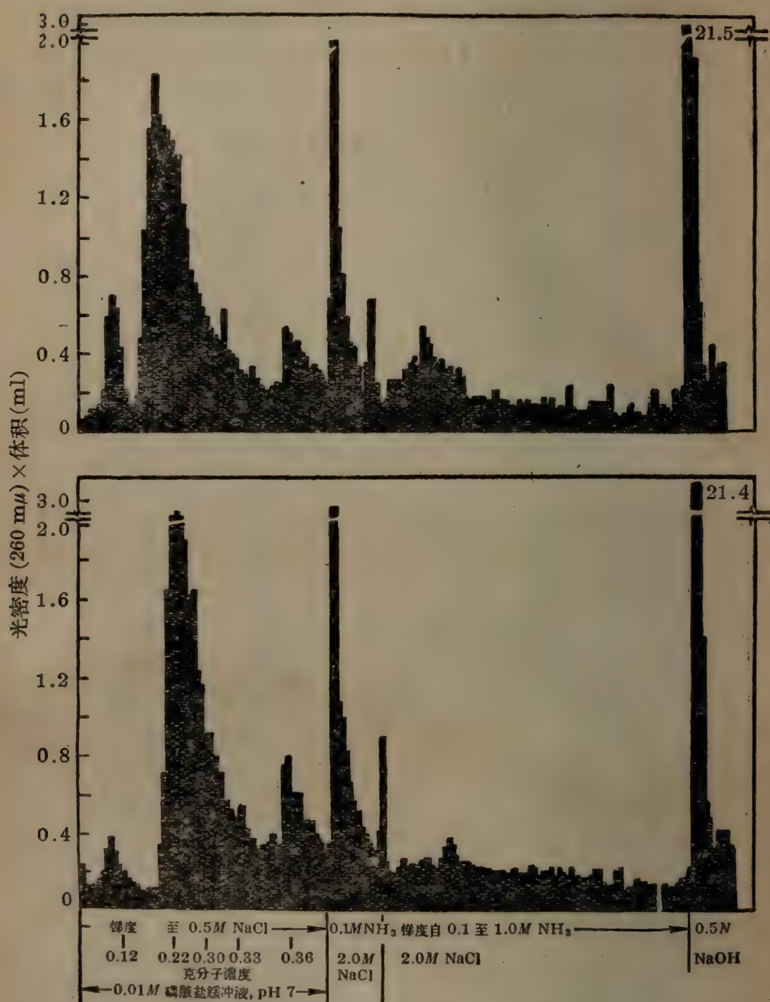


图 8　从相同起始物质按两种不同方法制备的人体粒細胞中的脫氧戊糖核酸的两个样品在 ECTEOLA 柱上的层析。上面的层析譜所表示的样品是采用 Kay、Simmons 和 Dounce 法制得的。下面的层析譜所表示的样品是用氯化鈉提取后再用氯仿-凝胶法除去蛋白质制得的(参看第二章)

(A. Bendich, H. B. Pahl 和 S. M. Beiser: *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1956, **21**, 34 頁)

一个样品則是在用氯化鈉提取后用氯仿-凝胶法制得的。这两个层析譜的彼此相似令人推想到这两种方法与 Shooter 和 Butler[5] 的发現相比較时，产生了几乎相同的产物。Shooter 和 Butler[5] 从沉降作用的研究断定氯仿-凝胶法在提取时引起了分級分离(参看38頁)。

重要的是在 ECTEOLA 柱上多核苷酸层析分离的基础必須加以建立。Bendich 及其同工者[28,30] 曾就这个問題从两个观点作了研究：(1) 柱的不同級分中嘌呤和嘧啶的組成成分，(2) 測定层析譜外形的形状作为脱氧戊糖核酸样品的分子大小的函数。从小牛胸腺脱氧核糖核酸級分的分析結果(表 1)可以看出嘌呤和嘧啶的成分是有显著的不同[28,31]。由此可見，阴离子交換法对于具有不同成分的脱氧核糖核酸的全部样品的級分曾完成了分离。檢查表1中碱基成分的克分子数值表明在級分的分析結果中沒有什么特征，这和 Chargaff、Crampton 和 Lipshitz[13] 以及 Brown 和 Watson[17] 的观察相反，他們发現腺嘌呤对鳥嘌呤和胸腺嘧啶对胞嘧啶的比例是随着洗脱液的氯化鈉濃度的增加而增大的。

分析数据(表1)的可能有意义的特点是腺嘌呤对胸腺嘧啶和鳥嘌呤对胞嘧啶的比例不等于1。象将在后面(第九章)所討論的，Watson-Crick 的脱氧戊糖核酸模型的重要特点就是这两个碱基对之間的特殊氫鍵，以及迄今为止所有脱氧戊糖核酸的分析都証明碱基对的比例非常接近于1(第四章)。由此可見，阴离子型交換法与其他方法在分离方面具有不同的根据，这些方法都能产生級分，而这些級分的碱基对的比例很少偏离于1。了解到底多核苷酸在阴离子型交換剂上的这样結合会不会对 Watson-Crick 模型中的特殊氫鍵造成断裂以致产生单独的多核苷酸鏈将是有趣的。若是如此，則特殊碱基对的比值偏离于1的原因就能够得到解釋。但是，有力的証据証明核酸在 ECTEOLA 柱上的吸附并不对核酸的結构发生重大的改变。柱級分的再层析产生一个层析譜，其中某一級分的大部分，如在原分級分离中的一样，出現在洗脱层析譜外形的相同位置处。核酸結构的一定改变，例如受热处

表 1　小牛胸腺脱氧核糖核酸的柱級分中的嘌呤-嘧啶組成

級分編号	占原来級分的 %*	洗脫液的組成		克分子碱基組成（腺嘌呤=1.00）†			$\frac{AD}{THY}$	$\frac{GU}{CY}$	$\frac{AD+GU}{THY+CY}$	回收 %‡
		NaCl 克分子濃度	NH_3 克分子濃度	胸腺嘧啶	鳥嘌呤	胞嘧啶				
原来的級分	100.0			0.97	0.77	0.77	1.03	1.00	1.02	95
50～51, 53～54	3.5	0.20～0.29		0.91	0.61	0.81	1.10	0.75	0.94	91
55～57	3.4	0.29～0.31		0.88	0.64	0.84	1.14	0.76	0.95	89
59～64	2.6	0.34～0.39		0.94	0.71	0.82	1.06	0.87	0.97	90
146～161	3.2	2.0	Tris, pH 9.5 §	0.97	0.73	0.83	1.03	0.89	0.96	92
197	3.3	2.0	0.10	0.88	0.67	0.74	1.14	0.91	1.03	89
199～200	3.6	2.0	0.10	0.95	0.64	0.74	1.05	0.87	0.96	98
206～211	3.1	2.0	0.10	1.01	0.75	0.79	0.99	0.95	0.97	95
236～237	3.3	2.0	0.25	0.98	0.63	0.74	1.02	0.85	0.95	100
239	5.4	2.0	0.35	0.95	0.68	0.72	1.05	0.95	1.01	95
242	6.9	2.0	0.45	0.98	0.78	0.78	1.02	1.00	1.01	99
244	3.1	2.0	0.53	0.94	0.86	0.90	1.06	0.96	1.01	104

* 这些数值代表每个級分中的脱氧核糖核酸的量占放在柱上的原来未分級分离物质的百分率

† 为 6 次分析的平均值，其中組分編号 146～161 中的鳥嘌呤分析仅为 2 次分析的平均值

‡ $\frac{\text{回收的碱基的全部微克分子}}{\text{水解产物中的磷的全部微克分子}} \times 100$

§ 三(羥甲基)氨基甲烷緩冲液，0.01 *M*

(A. Bendich, H. B. Pahl, G. C. Korngold, H. S. Rosenkranz 和 J. R. Fresco: *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 3955)

理时，就会导致层析譜外形的显著改变（图 9a）。更重要的可能証据是对肺炎球菌的具有轉移活性的脱氧戊糖核酸进行分級分离时，从层析柱上获得的合幷級分几乎具有和原物质相同的生物活性[30,38]。

存在于每个級分的脱氧戊糖核酸的量不足以作超速离心分析，但是 Bendich、Pahl、Rosenkranz 和 Rosoff[30] 曾对小牛胸腺的脱氧核糖核酸的合幷級分的某些区域的沉降系数分布作过测定。小牛胸腺核酸的层析譜見图 9a，而图 9b 是两个級分和原来的核酸对比时的沉降系数分布，这两个級分是用(1)0.16～0.24 M 氯化鈉溶液和 (2) 0.25～0.34 M 氯化鈉溶液在区域 I（图 9a）洗脫的。这些級分表示出更小的重量平均沉降系数，其数值随洗脱液濃度的增加而增大，幷且和以前所得的結果相符合[13,17]，同时也呈現出沉降系数的更狹隘的分布。

直接涉及层析譜上級分位置和分子大小間相互关系的有价值的报道是从研究受热处理的脱氧核糖核酸溶液而来。在低离子强度时对脱氧核糖核酸溶液（参看十一章，261 頁）的加热会使沉降系数和粘度降低；如果延长加热，則导致分子量的降低。受热处理脱氧核糖核酸溶液的层析譜和未受热处理的样品的层析譜均見图 9a。受热处理的溶液的层析譜显然与那些未經处理的核酸的层析譜不同，因为在水中加热的核酸的大部分都在区域 I 回收；可是在 pH 7.0 的 0.01 M 磷酸盐緩冲液中加热时会生成一种产物，这个产物在层析上几乎难以显出象未經加热处理的核酸所特有的第一个寬峰。因为从每一个层析柱上所收集的核酸的量是与曲綫下（图 9a）的面积成正比，因此可以看出将核酸在 0.01 M 磷酸盐緩冲液中加热会使第一个高峰几乎完全消失，同时在区域 III 中的核酸亦大量消失（卽在 0.1～1.0 M 氨和 2 M 氯化鈉的范圍內）。失去的級分出現在区域 II，这大概与通常在此区域內所洗脫的物质在一起。因为未經加热处理的物质的层析譜显示出的最大量的核酸是在区域 III 內，因此可以預料到这个区域內含有多量的分子量較大的物质，这些物质在水中加热时几乎完全消失，而

随后可以在第一高峰处，即区域 I 处回收。因为热对脱氧戊糖核酸会减小其分子的大小，由此亦可推知区域 I 內的洗脱級分亦是小分子的。这样层析分級分离就显出与分子的大小有关，如同与組成有关一样。

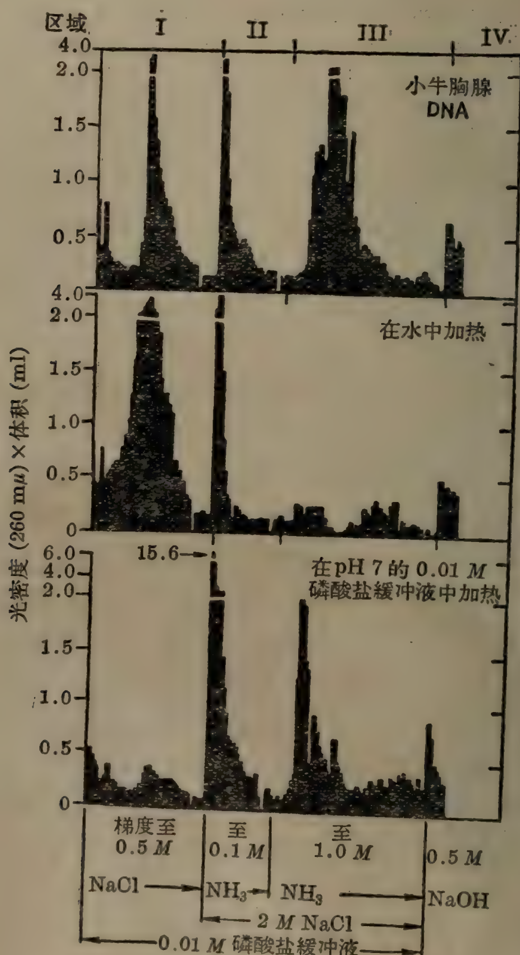


图 9a　加热对小牛胸腺脱氧核糖核酸层析譜的影响
(A. Bendich, H. B. Pahl, H. S. Rosenkranz 和 M. Rosoff: *Symp. Soc. exp. Biol.* 1958, **12**, 38 頁)

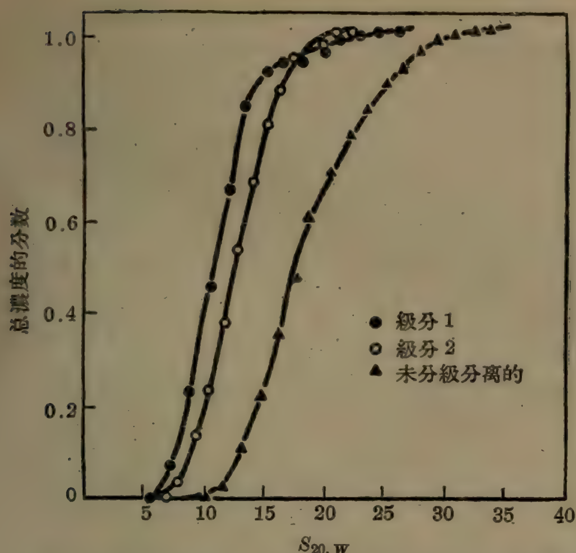


图 9*b* 在区域 I (图 9*a*) 洗脱的脱氧核糖核酸的沉降系数分布
(級分 1 是用 0.16～0.24 *M* 氯化鈉洗脫的；級分 2 是用
0.25～0.34 *M* 氯化鈉洗脫的)
(*Symp. Soc. exp. Biol.* 1958, **12**, 36 頁)

圍繞任何一个分級分离的步驟，其最大兴趣集中在提取出一个能够代表某一特殊遺傳功能的脱氧戊糖核酸的級分的可能性。唯一制备出来的具有生物功能的脱氧戊糖核酸是从肺炎球菌中获得的具有轉移活性的脱氧戊糖核酸，而这种核酸已成为层析研究的主題。在这些研究中，各个級分的轉移活性也曾被檢查过[28,39]。肺炎球菌中具有轉移活性的脱氧戊糖核酸本来就具有四种可証明的遺傳特性，这些特性包括对青霉素、鏈霉素和磺胺的抵抗作用的改变，以及对甘露醇利用的改变。从发生于某一单株的細菌分离出来的核酸制备物根本是以单独无关的动因随便誘导出这些遺傳轉变作用，虽然相当数目的变种細胞都显示出两种性质，卽甘露醇的利用和对鏈霉素的抵抗作用。这两种性质被认为是相关的或联系的事件。因此，脱氧戊糖核酸的制备物似乎至少包含有五个級分，它們都可以按分子的形式鉴定出来，而其中的四个級分中的

每一个都只与一个可鉴定的遺傳性质有关。在第五个級分中，上述的这两种性质似乎联系在一起。具有轉移活性的脫氧戊糖核酸的层析譜見图 10。某些級分对鏈霉素的轉移活性則列在表 2。級分的相对活性相差甚大，某些級分具有至少 50 倍于其他級分的活性。最活潑的級分的活性約为原来物质的活性的五倍。这些級分就是与交換剂(ECTEOLA)結合得最牢固的級分在一起的，并且是在碱性范圍內被洗脫下来的。用碱处理很可能会破坏一些活性，因此这些級分事实上原来就具有比所观察到的更大的活性。Ephrussi-Taylor[40] 应用硅藻土-組蛋白柱以及 Lerman[22] 应用甲基化的牛血清蛋白所进行的同位素标記的具有轉移活性的脫氧

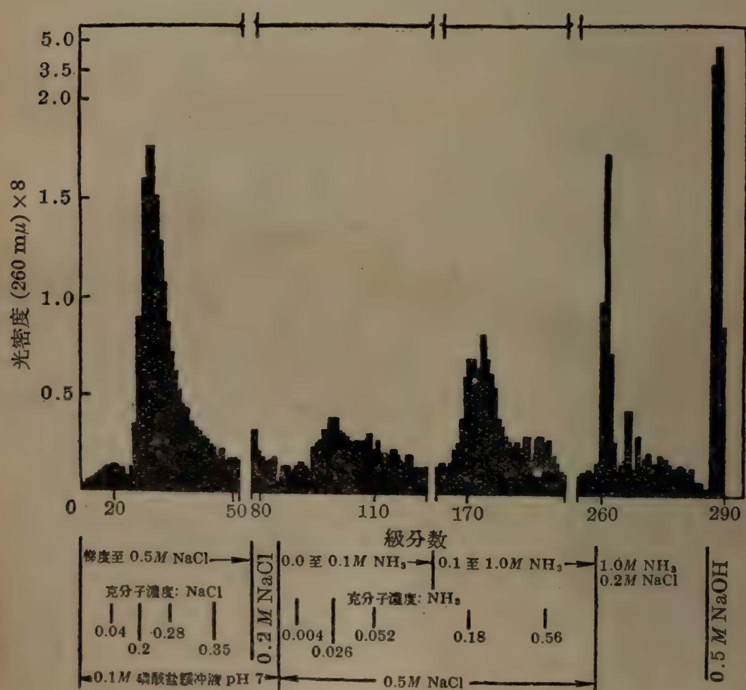


图 10　在 ECTEOLA 柱上具有轉移活性的脫氧戊糖核酸的层析譜
(A. Bendich, H. B. Pahl 和 S. M. Beiser: *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1956, **21**, 34 頁)

核糖核酸的分級分离，都获得了类似的結果。

从表 2 所記載的数据可以明显地看出使受体細胞轉变为对鏈霉素有抵抗作用的細胞是与許多級分有关。前面的級分 (no. 25) 和后面的級分(no. 260)一样，均具有轉移活性。有許多解釋都可以用来說明这种变化。一个可能性是分子大小的不均一性的影响大于生物学的(化学的)不均一性的影响，而前面的級分，虽然所含的分子的大小比較小，但仍含有特殊有关的轉移結构；另一可能性是在每个分子中含有一个以上的活性部位，而这些活性部位在所有分子中可能不是都位于同一相应的位置上。不論眞正的解釋应該怎样，显然这种分級分离方法在目前还不能产生每一个都具有特异的遺傳活性的級分。

表 2 肺炎球菌脫氧戊糖核酸层析級分的鏈霉素轉移活性

級分編号	洗脫液成分		洗脫液的 pH	相对轉移活性*		
	NaCl 克分子濃度	NH_3 克分子濃度				
原来的級分	—	—	7.0	1.0	1.0	1.0
25	0.17	—	7.0	0.7	0.8	0.7
27	0.19	—	7.0	0.2	0.4	0.2
29	0.21	—	7.0	0.5	0.6	0.4
32	0.25	—	7.0	0.4	0.1	0.04
35	0.28	—	7.0	1.2	0.8	1.9
40	0.32	—	7.0	0.9	0.7	1.2
67	0.45	—	7.0	0	0.1	0.06
78	0.47	—	7.0	0	0.1	0.03
99	0.50	0.02	8.4	1.9	1.8	2.0
173	0.50	0.22	9.5	—	5.1	4.2
190	0.50	0.56	10.4	1.1	1.0	—
260	2.00	1.00	11.0	—	5.1	4.8

* $\frac{\text{每微克級分中的轉移物质}}{\text{每微克原来物质中的轉移物质}}$。列在三个栏中的活性数值是在不同日期測定的

(A. Bendich, H. B. Pahl 和 S. M. Beiser: *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1956, **21**, 42 頁)

戊糖核酸的不均一性和分級分离

Chantrenne[41] 在戊糖核酸的不同金属盐的溶解度的基础上，首先提出了从細胞中提取的全部戊糖核酸样品是不均一的見解。Chantrenne 分离出两个級分，随后 Ghuysen[42] 又对这两个級分的均一性重新进行了研究。Bacher 和 Allen[43] 亦在溶解度测定的基础上檢查了一些戊糖核酸的不均一性。但是，这些分級分离方法一般都不能得到多于两个以上的級分，其中一个具有低的溶解度，而另一个則具有高的溶解度。Ghuysen 和 Desreux[44,45] 在 pH 3.5 和 5.5 时用分級提取方法并且用醋酸-丙酮-水的混和物或甲醇-氯化鈉-醋酸盐的緩冲混和物作分段制备，分級分离了酵母的核糖核酸。用这个分級分离方法获得了十个級分，它們都具有相同的嘌呤-嘧啶比例。这些級分中有許多含有相同的分子量但具有不同的溶解度。

随着离子交換树脂在脫氧戊糖核酸分級分离上的满意使用，Miura 和 Suzuki[46] 与 Bradley 和 Rich[47] 应用了这个技术作戊糖核酸的分級分离。前两个研究者应用 Dowex-2（氯型，交联度10%）作交換剂，而后两个研究者則应用 Peterson 和 Sober 所制备的 ECTEOLA 柱作为交換剂。

将 Dowex-2[46] 柱反复洗滌，先用酸、碱和水洗，然后再用 1 *M* 氯化鈉溶液作充分洗滌，直至洗液不再含有紫外吸收物质时为止。树脂的吸附量約为每 10 ml 树脂 3.5 mg 戊糖核酸，而流速則維持在 0.2 毫升/平方厘米/分。将核酸溶于 0.2 *M* 氯化鈉溶液中，层析柱亦用此氯化鈉溶液进行洗滌。然后用濃度逐步增加的氯化鈉溶液（从 0.5 *M* 到 5 *M*）将核酸加以洗脫，洗脫液中核酸的濃度則由在 260 mμ 处测量的光吸收来决定。

一个典型的洗脫曲綫見图 11，图中表示出酵母中核糖核酸的六个級分。如再层析所示的，这个方法的重复性是很好的。級分的分子量是用表面槽紋 (surface trough) 法测定的。这个方法相当便利，因为需要核酸的量极少，但测定結果不甚准确。級分的分

子量被发現是随着洗脱液氯化鈉濃度的增加而增大。从嘌呤和嘧啶的分析的結果发現它們的成分在級分間幷沒有显著的差别，这与 Ghuysen 和 Desreux[44,45] 的观察相符合。

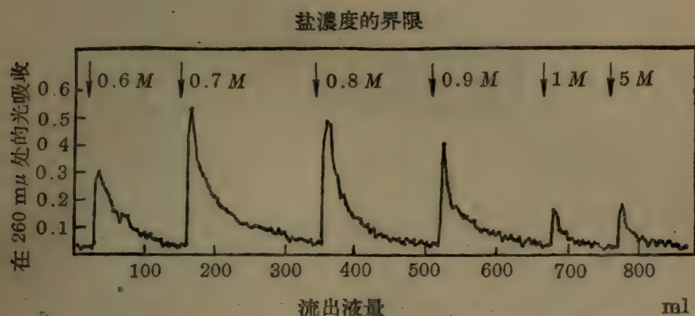


图 11 从 Dowex-2 柱用氯化鈉溶液作戊糖核酸的不連續洗脫
(K. Miura 和 K. Suzuki: *Biochim. biophys. Acta* 1956, **22**, 566 頁)

表 3 戊糖核酸的平均沉降系数 ($\bar{S}\times10^{13}$)

洗脫液 NaCl 克分子濃度	酵母 A	酵母 B	小牛肝	肌肉	酵母 C
	未分級分离的				
	0.60	0.92	2.24	3.89	6.91
	分級分离的				
0.05	0.06	0.11	—	—	—
0.10	0.17	0.29	—	—	—
0.15	0.60	0.95	0.86	—	—
0.20	1.42	1.76	2.39	2.97	4.41
0.25	—	—	3.76	4.47	6.28
0.30	—	—	—	4.21	5.80
0.35	—	—	—	—	4.82

(摘自 D. F. Bradley 和 A. Rich: *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, 5901 頁)

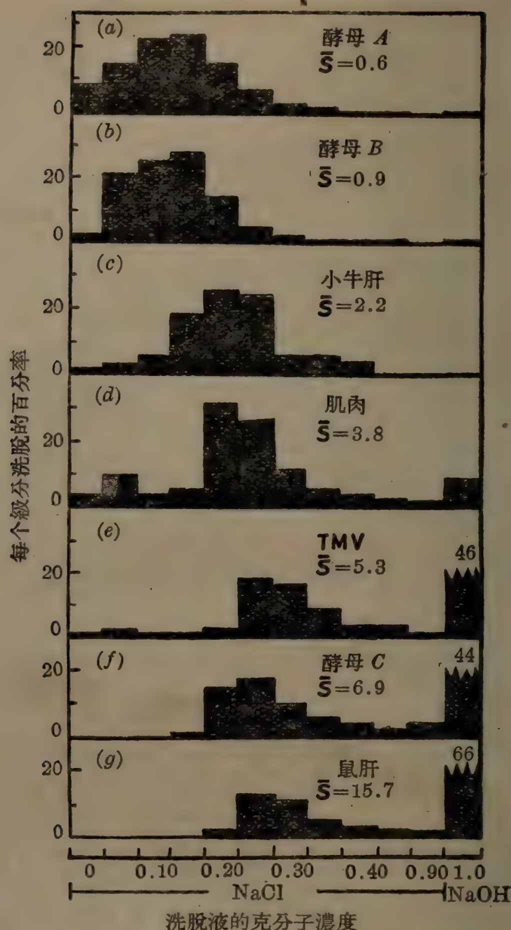


图 12　在 ECTEOLA 柱上不同戊糖核酸的层析譜
(D. F. Bradley 和 A. Rich: *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, 5899 頁)

Bradley 和 Rich[47] 的实驗主要涉及在 ECTEOLA 柱上作分級分离后从各种戊糖核酸所得級分的沉降常数的改变。他們所应用的实驗技术与前述 Bendich 及其同工者所用的技术极相类似[31]。图 12 列出了七种不同戊糖核酸样品的层析譜和未被分級分离的核酸的平均沉降系数($\bar{S}$)。当沉降系数增大时，洗脫层析譜

外形向盐濃度較高的方向移动。图 12(e)是烟草花叶病毒的戊糖核酸的洗脫层析譜外形，对于这种核酸 Bradley 和 Rich 曾加以研究，其目的是希望它能够較細胞的核酸更为均一。但事实并非如此，它的一部分不均一性可能是由提取时所发生。表 3 列出了戊糖核酸的不同級分的平均沉降系数，其数值大部分与 Miura 和 Suzuki[46] 的分子量測定的結果相符合[46]。在他們所得的結果中，沉降常数是随着氯化鈉洗脫液濃度的增加而增大的。

这些研究进一步强調了用离子交換柱作分級分离时分子的大小对于不均一性影响的重要性。这种影响的重要性亦在分級分离脫氧戊糖核酸时观察到，并且这种影响显然会掩蔽了化学不均一性的影响。

(汪　經　譯)

参考文献

[1] Bendich, A. *Essays in Biochemistry* (Ed. S. Graff): John Wiley, New York, 1956, p. 14

[2] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *Nature, Lond.* 1955, **175**, p. 500

[3] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, p. 734

[4] Oth, J. and Desreux, V. *I.U.P.A.C. Symposium on Macromolecular Chemistry: Ric. Sci. Mem.* 1955, Supplement A, p. 447

[5] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *Nature, Lond.* 1956, **177**, p. 1033

[6] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 705

[7] Peacocke, A. R. and Schachman, H. K. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **15**, p. 198

[8] Butler, J. A. V. and Shooter, K. V. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 540

[9] Mirsky, A. E. and Ris, H. *J. gen. Physiol.* 1947, **31**, p. 7

[10] Schneider, W. C. and Hogeboom, G. H. *Cancer Res.* 1951, **11**, p. 1

[11] Bendich, A. *Exp. Cell Res.* 1952, **3**, Supplement 2, p. 181

[12] Bendich, A., Russell, P. J. and Brown, G. B. *J. biol. Chem.* 1953, **203**, p. 305

[13] Chargaff, E., Crampton, C. F. and Lipshitz, R. *Nature, Lond.* 1953, **172**, p. 289

[14] Crampton, C. F., Lipshitz, R. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1954, **211**, p. 125

[15] Lucy, J. A. and Butler, J. A. V. *Nature, Lond.* 1954, **174**, p. 32

[16] Sherrat, H. S. A. and Thomas, A. J. *J. gen. Microbiol.* 1953, **8**, p. 217

[17] Brown, G. L. and Watson, M. *Nature, Lond.* 1953, **172**, p. 339

[18] Brown, G. L. and Martin, A. V. *Nature, Lond.* 1955, **176**, p. 971

[19] Hoffpauir, C. L. and Guthrie, J. D. *Text. Res.* (*J.*) 1950, **20**, p. 617

[20] Campbell, D. H., Leuscher, E. and Lerman, L. S. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1951, **37**, p. 575

[21] See also Brown, G. L. and Brown, A. V. *Symp. Soc. exp. Biol.* 1958, **12**, p. 6

[22] Lerman, L. S. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **18**, p. 132

[23] Tiselius, A., Hiertén, S. and Levin, Ö. *Arch. Biochem. Biophys.* 1956, **65**, p. 132

[24] Main, R. K. and Cole, L. J. *Arch. Biochem. Biophys.* 1957, **68**, p. 186

[25] Semenza, G. *Ark. Kemi* 1957, **11**, p. 89

[26] Tiselius, A. *Ark. Kemi* 1954, **7**, p. 443

[27] Bendich, A., Fresco, J. R., Rosenkranz, H. S. and Beiser, S. M. *J. Amer. chem. Soc.* 1955, **77**, p. 3671

[28] Bendich, A., Pahl, H. B. and Beiser, S. M. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1956, **21**, p. 31

[29] Bendich, A., Pahl, H. B. and Brown, G. B. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 378

[30] Bendich, A., Pahl, H. B., Rosenkranz, H. S. and Rosoff, M. *Symp. Soc. exp. Biol.* 1958, **12**, p. 31

[31] Bendich, A., Pahl, H. B., Korngold, G. C., Rosenkranz, H. S. and Fresco, J. R. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 3949

[32] Sober, H. A. and Peterson, E. A. *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, p. 1711

[33] Sober, H. A. and Peterson, E. A. *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry* (Ed. C. Colman and T. R. E. Kressman): Interscience, New York, 1957, p. 318

[34] Peterson, E. A. and Sober, H. A. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 751

[35] Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckoff, M. M. and Peterson, E. A. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 756

[36] Friedkin, M. and Wood, H. *J. biol. Chem.* 1956, **220**, p. 639

[37] Osawa, S. and Sakaki, T. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **25**, p. 195

[38] Pahl, H. B., Beiser, S. M. and Bendich, A. *Fed. Proc.* 1957, **16**, p. 230

[39] Bendich, A., Beiser, S. M., Fresco, J. R. and Hotchkiss, R. D.—

unpublished results quoted by Bendich, A., reference 1
[40] Ephrussi-Taylor, H. *Advanc. Virus Res.* 1955, **3**, p. 275
[41] Chantrenne, H. *Bull. Soc. chim. Belg.* 1946, **55**, p. 5
[42] Ghuysen, J.-M. *Bull. Soc. chim. Belg.* 1950, **59**, p. 490
[43] Bacher, J. E. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1950, **184**, p. 511
[44] Ghuysen, J.-M. and Desreux, V. *Bull. Soc. chim. Belg.* 1951, **60**, p. 410
[45] Ghuysen, J.-M. and Desreux, V. *Bull. Soc. chim. Belg.* 1952, **61**, p. 181
[46] Miura, K. and Suzuki, K. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **22**, p. 565
[47] Bradley, D. F. and Rich, A. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 5898

第四章　核酸組分的提取和核酸的組成

嘌呤碱、嘧啶碱、核苷和核苷酸的提取

核酸的水解

脱氧戊糖核酸和戊糖核酸的水解可产生各种不同的产物。这些产物包括嘌呤碱和嘧啶碱，依照核酸类型的戊糖和脱氧戊糖，相应的磷酸化糖类，核苷，核苷酸与寡核苷酸（即分子量甚低的多核苷酸）以及由这些物质进一步破坏而成的各种降解产物。核酸的类型和水解剂的本性对确定降解的进行非常重要。用碱水解时，这两类核酸表現出全然不同的性质，其原因将在第八章中討論。戊糖核酸在室温下用 1 M 碱液处理时立即水解成单核苷酸，而脱氧戊糖核酸在这些条件下很少受到类似水解的破坏。要使脱氧戊糖核酸变为可溶于酸的寡核苷酸[1]必須将其在 100°C 下在 1 M 碱液中处理 4 小时。一般来讲，嘌呤和嘧啶的戊糖苷較它們的脱氧戊糖苷更难分裂。但是，这两类核酸的特征是，嘌呤与戊糖或嘌呤与脱氧戊糖所成的苷的鍵比相应的嘧啶与戊糖或嘧啶与脱氧戊糖所成的苷的鍵对酸更为不稳定。因此当这两类核酸用酸水解时就立刻生成嘌呤碱——腺嘌呤和鳥嘌呤，而在戊糖核酸中的嘧啶碱則傾向于以单核苷酸的状态存在，若是脱氧戊糖核酸的嘧啶碱，則以核苷二磷酸的状态存在。只有在剧烈的条件下核酸才能被水解成游离的嘧啶碱——胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶。

水解到嘌呤碱和嘧啶碱

用比較温和的酸水解可以很容易地从戊糖核酸得到腺嘌呤和鳥嘌呤。为了制备[2, 8]和分析[3]的目的，曾将戊糖核酸用盐酸醇溶液[2, 3]以及自 0.4 N 至 6 N[3~7] 的不同濃度的盐酸和硫酸水溶液在 100～120°C 下处理 1 至 2 小时。在水解步驟中，尤其是将其

用于分析时，所遇到的主要困难是使嘌呤碱全部释出而不引起任何脱氨作用。人們曾怀疑在 120°C 下用 0.5 N 盐酸将核酸处理 2 小时是否会使嘌呤碱全部释出[4,9]。但用紙层析法[3]以及生成銀盐沉淀的方法[7]从相应的核苷酸回收的腺嘌呤和鳥嘌呤的量来判断，在 100°C 下用 1 N 酸处理 1 小时已能够相当满意地使嘌呤碱全部释出。这些条件也曾应用于戊糖核酸的分析，并使含氮的組分如已熟知的嘌呤和嘧啶衍生物几乎全部回收[6]。但是，测定嘌呤濃度的同位素稀釋法曾指出，用这种方法处理时約有 7% 的嘌呤可能因脱氨而被破坏。

虽然用上述方法可使戊糖核酸释出全部的腺嘌呤和鳥嘌呤，但是嘧啶碱仍将以核苷酸或核苷的形式保留下来，因为它們的苷鍵对酸水解有更大的抵抗能力。經这样的处理后，即使是嘧啶組分仍可被分离出来[10,11]，或用分析方法加以測定[12~14]，但为了分析的目的，常安排适当的条件使嘧啶碱能和嘌呤碱同时释出。

經常用以获得全部碱基的各种不同方法反映出要得到一个完善方法的困难性。胞嘧啶和尿嘧啶可用 25% 的硫酸在 175°C 下水解酵母核糖核酸 2 小时而制得[15]。但是，在这些条件下，胞嘧啶会脱氨而变成尿嘧啶。其他曾被采用过的試剂包括在 120°C 时的 0.4~0.6 N 盐酸[4]、175°C 时的 98~100% 的甲酸[3]、175°C 时的 20% 的盐酸[3]、12 N 过氯酸[16]以及用三氟乙酸在 155°C 下水解 1 小时[17]。用 0.4~0.6 N 盐酸在 120°C 下水解的結果表示出当酸的濃度增加时，嘧啶碱的释出量亦增加；可是，胞嘧啶的产量对尿嘧啶来讲是低了，这表明脱氨作用已經发生。用濃的甲酸可防止胞嘧啶的脱氨作用，可是經这样处理后，所得的尿嘧啶的量极低，而且这种方法曾被发現不适宜用作尿嘧啶核苷酸的定量水解[18]。用 12 N (70~72%) 过氯酸在 100°C 下水解 1 小时几乎可以全部得到所有的碱基[16]，虽然嘧啶碱沒有全部被回收。但是这个方法，以及較少使用的甲酸方法[3]，曾被广泛地应用于核酸的分析。近来，Dutta、Jones 和 Stacey[17] 曾介紹采用三氟乙酸在 155°C 下水解 80 分钟；这个方法不会引起胞嘧啶核苷酸的显著脱氨，并且

还有一个优点，即若用紙层析法进行分析时，将不会使滤紙焦化。

用比較温和的方法处理脱氧戊糖核酸时可以很容易地使其中的腺嘌呤和鳥嘌呤釋出。最早的方法是采用2%的酸在100°C下水解10分钟。所得的产物除嘌呤碱外，还有一种高分子量的、不易識别的殘余物，这种殘余物称为胸腺酸[19]，因为它只含有胸腺嘧啶；但嗣后发現它还含有胞嘧啶[20, 21]。用控制更严格的制备方法[22~24]，即在37°C下、pH 1.6时水解24小时或在100°C下、pH 2.8时水解1小时，可得到一个更易于重复产生的被称为去嘌呤酸的物质。盐酸醇溶液曾用于嘌呤碱的定量測定[3, 25]。当用更强的酸时，則含有嘧啶碱的多核苷酸殘基可进一步被降解成胸腺嘧啶和胞嘧啶脱氧戊糖二磷酸以及相应的单核苷酸。

用盐酸、过氯酸、甲酸和三氟乙酸进行水解的方法曾被用作嘌呤碱和嘧啶碱的定量測定，其所用的条件和水解戊糖核酸时所用的条件頗为相似。在120°C下用盐酸（6 N）水解2小时可以得到很好的嘧啶碱产量，但嘌呤碱則遭受一些破坏[25~27]。用濃度为7.5 N或12 N的过氯酸[16]在100°C下水解1小时可以得到更好的結果。当用12 N过氯酸水解时，則将損失少量的胸腺嘧啶，但是这种損失可由对每毫克脱氧戊糖核酸使用不超过15 μl的过氯酸而减低。使用甲酸作水解剂时曾得到最滿意的結果，其所用的条件是[3]，在175°C下用98～100%的甲酸水解2小时，但也可用更短的加热时間[28, 29]。使用更弱的甲酸（88%）在175°C下水解30分钟亦曾得到良好的結果[30]。但不論所用的酸的濃度如何，鳥嘌呤和羥甲基胞嘧啶的回收量都可以由使用比較大一些的酸对核酸的比例（500 μl/mg）和避免在氧化气氛中进行水解而得到增加。近来发現用三氟乙酸在155°C下水解1小时可以得到非常滿意的定量結果[17]。

水解到核苷酸

如已經观察到的，戊糖核酸容易被水解成单核苷酸[31]。水解可以在室温下用1 N氫氧化鈉或1 N盐酸来完成。但是后一方法較不适宜，因为戊糖与嘌呤所成的苷的鍵有被断裂的危險[11, 32, 33]。

关于这种水解，其主要困难在于防止进一步水解成为核苷和防止脱氨。在用过的方法中，似乎满意的是：在 30°C 下及 pH 13～14 时水解 12 小时(过夜)[18]，用 0.5N 氢氧化钠在 20～22°C 下水解 18 小时[34]，用濃的氢氧化銨在 45°C 下水解 8 天[34]（在其他条件下用氨水解会产生核苷）和用 0.3N 氢氧化钠或氢氧化鉀在 37°C 下水解 18 小时[35~37]（更高的碱濃度，例如 1N 氢氧化鉀，会引起胞嘧啶核苷酸脱氨）。用这些方法所得到的核苷酸均为核苷-2′-和-3′-磷酸的混合物(参看下文)。

由于嘌呤脱氧戊糖核苷酸的苷鍵对酸不稳定以及这种核酸对碱水解的抵抗作用，因此化学水解并不是一个从脱氧戊糖核酸制备单核苷酸的满意方法。在产生碱水解的条件下，例如用 1N 氢氧化钠在 100°C 下进行水解 4 小时，会产生寡核苷酸以及使嘌呤碱和胞嘧啶几乎完全脱氨[1]。但是，温和的酸水解将产生嘧啶-5′-磷酸和嘧啶-3′,5′-二磷酸的混合物[38~44]。

核酸的酶促水解亦可用于核苷酸的制备。但是，用核糖核酸酶使戊糖核酸水解，其作用不能完全[45]。这是因为核糖核酸酶不能水解戊糖核酸中所有核苷酸間的鍵，而只有那些 3′-嘧啶核苷磷酸基团与相邻的嘌呤或嘧啶核苷酸間的 5′-羥基間的鍵被水解的緣故[46~48]。因此相邻的嘌呤核苷酸間的鍵以及在一个 5′-嘧啶核苷磷酸基团*和一个相邻的嘌呤或嘧啶核苷酸的 3′-羥基間的鍵却不被水解。所以經核糖核酸酶水解的最終产物是 3′-尿嘧啶核苷酸和 3′-胞嘧啶核苷酸以及寡核苷酸的混合物。核苷-5′-磷酸也可以从戊糖核酸制得，但是这些核苷酸不能借化学試剂的水解而获得，其原因将在第八章中討論。可是蛇毒磷酸二酯酶，当除去 5′-单酯酶的活力后能产生一个含有四种 5′-核苷酸、嘧啶-2′,5′-和嘧啶-3′,5′-二磷酸单核苷酸以及嘌呤核苷的混合物[49~51]。从这个混合物中可用离子交换层析法将 5′-核苷酸分离出来。

脱氧戊糖核苷酸也可以用酶促水解来制备。在用小牛胰腺的脱氧核糖核酸酶将脱氧戊糖核酸消化后，用离子交换层析法可以

* 原文誤，已改正(譯者注)

分离出产量很高的脱氧戊糖核苷-5′-磷酸[52, 53]。近来曾有人报道应用从 *Micrococcus pyogenes*[53 a] 中或从小牛脾脏[53 b] 中分离出来的脱氧核糖核酸酶来制备脱氧戊糖核苷-3′-磷酸。

水解到核苷

戊糖核苷可以从戊糖核酸用較那些用于核苷酸制备的更剧烈的水解条件来制备。Levene 和 Jacobs[53 c] 应用了濃的氫氧化銨在175～180°C 及加压下进行水解3.5小时,而 Bredereck、Martini 和 Richter[53 d] 則使用吡啶的水溶液。为了增加产量,对这两个方法都曾作过修改[53e~g]。应用上述两种化学水解中的任何一种,核苷也可以从个别核苷酸中制得[53g, h]。在这两种化学水解中,通常以吡啶的水解更为可取,否則就要采用磷酸酶进行水解[53i~k]。

脱氧戊糖核酸中磷酸二酯鍵的稳定性和嘌呤脱氧戊糖核苷中苷鍵的不稳定性使水解成为脱氧戊糖核苷时不能应用酸和碱。因此必須用酶促水解来制备核苷。Anderson、Dekker 和 Todd[61] 曾叙述了一个方法,先将脱氧戊糖核酸用脱氧核糖核酸酶水解,水解后不立即进行分离,而在銀离子的存在下使腺嘌呤脱氧戊糖苷脱氨酶的作用受到抑制,然后用腸磷酸酶水解,将脱氧戊糖核苷酸中的磷酸除去。

水解产物的离子交換层析分离

用离子交換层析法以分离从核酸水解所得的嘌呤碱、嘧啶碱、核苷和核苷酸的方法不仅可作为分析的方法,而且也可用于制备这些化合物。近年来这个方法曾被相当广泛地用于制备不能用其他方法制备的核苷和核苷酸。这个方法的最大成就之一就是能够分离出磷酸基团在戊糖的 2′- 和 3′- 位置上的戊糖核苷酸的异构体。Cohn 及其同工者[54, 55] 曾大大地发展了这个方法。

其他文献[56]曾广泛地叙述了离子交換层析的一般方法。核酸降解产物的分离則往往使用标准的技术。通常是測定溶液在 260 mμ 处的光吸收程度作为洗脱液的分析。最常用的离子交換树脂为:强碱型阴离子交換剂 Dowex-1、Dowex-2 和 Amberlite-

IRA-400；强酸型阳离子交换剂 Dowex-50 和 Amberlite-IR-120 以及弱酸型阳离子交换剂 Amberlite-IRC-50。

游离的嘌呤碱和嘧啶碱以及核苷可以含有各种可电离的基团。如果不考虑只在强碱中才电离的糖羥基，则这些可电离的基团为：腺嘌呤、鳥嘌呤和胞嘧啶中的氨基以及鳥嘌呤、尿嘧啶和胸腺嘧啶中的 —NH—CO— 的解离。这两类电离基团的 pK'_a 值(参看第七章)分别在 3.2～4.5 和 9.5～10.0 的范圍内。腺嘌呤还有一个弱酸的解离，其 pK'_a 值为 9.8。这个数值极可能代表咪唑环中 —NH— 到 —$\bar{N}$— 的解离。

至于核苷酸，除上述的解离外，还存在着磷酸的一級和二級解离，它們的 pK'_a 值約分别为 1.0 和 6.5。因为这些带电的基团不同，因此洗脫可以用增加竞爭离子的濃度并維持溶液 pH 不变，因而使离子上的电荷恒定的方法来进行，或更通常地用增加竞爭离子的濃度但改变其 pH，使被吸附的离子上的电荷减少或增加的方法来进行。

核苷酸中磷酸基团的存在使核苷酸的离子交换行为与嘌呤碱、嘧啶碱和核苷类的离子交换行为有明显的不同，因此这两类物质的离子交换行为将分别予以討論。

在酸性溶液中，鳥嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶的氨基以及相应核苷的氨基均解离为阳离子，其 pK'_a 值按所述次序而增加(参看表 8 和 9，第七章)。尿嘧啶和胸腺嘧啶以及相应的核苷沒有氨基，因而不被氫型阳离子交换剂吸附到任何可以覺察的程度。图 13 表示出人工混和的酵母核糖核酸的四个碱基在 Dowex-50 (H^+ 型) 柱上用阳离子交换的分离。洗脫是在提高竞爭离子的濃度而不改变其电荷的情况下进行[54, 55, 57]。在这个交换系統中胸腺嘧啶犹如胸腺嘧啶核苷和尿嘧啶核苷一样，不能与尿嘧啶分开，因为它們不是阳离子，所以不被吸附。胞嘧啶核苷先于胞嘧啶交换而出，而 5-甲基胞嘧啶则紧随之[58]。增高溶液的 pH 以进行洗脫的方法并不曾用于分离嘌呤碱和嘧啶碱的混合物，虽然 Reichard 和 Estborn[59] 曾用这个方法以分离同位素标記的脫氧戊糖核苷。但是一般来

讲，这个方法并不被推荐作为核苷的制备，这是因为嘌呤苷鍵不稳定，以致嘌呤核苷会在柱上发生进一步水解的緣故[57, 60, 61]。

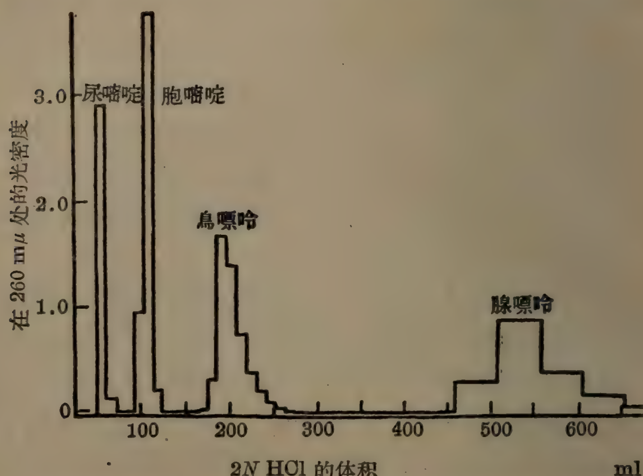


图 13　用阳离子交换柱(Dowex-50-H+)所作的腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶混合物的分离

(W. E. Cohn: *Science* 1949, **109**, 377 頁)

—NH—CO— 的解离属于鳥嘌呤、尿嘧啶和胸腺嘧啶以及相应的核苷的阴离子特性。在腺嘌呤中，咪唑环可以解离，但是在腺嘌呤核苷中，由于在形成苷鍵时酸性氫原子被除去，因而咪唑环不能解离。胞嘧啶和胞嘧啶核苷不具有阴离子的特性。图 14 表示出五个嘌呤碱和嘧啶碱的分离情况。核苷的洗脫峰位置如图 15 所示趋向于与相应的碱基的洗脫峰位置相重叠。但是腺嘌呤核苷是一个例外；氫原子从咪唑环失去会使酸性特性全部丧失，因此使腺嘌呤核苷与胞嘧啶核苷和胞嘧啶具有相似的交換能力，因而极难使它們分开(图 15)。但是，Anderson、Dekker 和 Todd[61] 采用了一个适合于大規模制备脫氧戊糖核苷的方法，曾成功地分离出腺嘌呤和胞嘧啶的脫氧戊糖核苷。他們用甲酸銨緩冲液 (pH 9.8) 将腺嘌呤和胞嘧啶的脫氧戊糖核苷一起从 Dowex-2 柱上洗脫下来，然后将一水合腺嘌呤脫氧戊糖核苷結晶出来，并用弱酸型阳离子

交换剂 Amberlite-IRC-50 将上层清液凈化。这样他們就获得了胞嘧啶核苷。

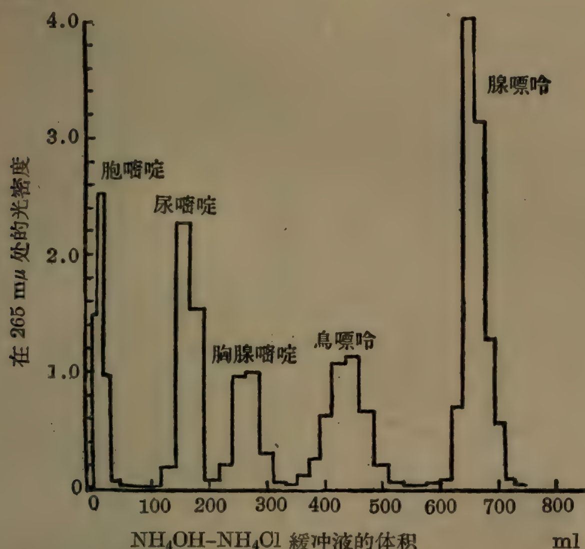


图 14　用阴离子交換柱(Dowex-1-氯化物)所作的腺嘌呤、鳥嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶混合物的分离
(W. E. Cohn: *Science* 1949, **109**, 377 頁)

由于核苷酸具有支配交换行为的磷酸基团，因此它們的离子交换特性与嘌呤碱、嘧啶碱和核苷的离子交换特性有所不同。胞嘧啶核苷酸、腺嘌呤核苷酸和鳥嘌呤核苷酸因含有氨基和磷酸基，因此在低到相当低的 pH 值时仍保留其阴离子性质。这些两性电解质的等电点是在 pH 1 和 2 之間。如图 16 所示，在 pH 5.5～2.0 范圍內，当 pH 因氨基的电离而减小时，凈負电荷亦减少，并且因为氨基在不同的核苷酸中具有不同的 pK'_a 值，因此在某一給定的 pH 时，个别核苷酸上的凈电荷就不相同。凈电荷的不相同就构成了离子交换分离的基础。尿嘧啶核苷酸（胸腺嘧啶脫氧戊糖核苷酸亦然）沒有氨基，因而不带正电荷。图 16 所示的在 pH 2.0 以下的負电荷的改变是由于离子化的一級磷酸解离的滴定所致。

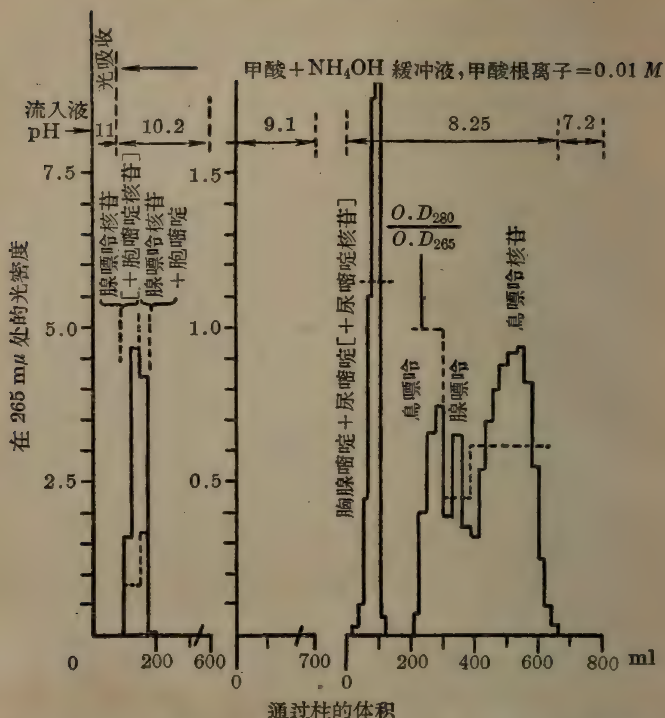


图 15 用阴离子交换方法(Dowex-1-甲酸盐)所作的嘌呤碱、嘧啶碱、核苷和核苷酸的分离

(W. E. Cohn: *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, 1474 頁)

由于交换剂对嘌呤碱的吸引能力超过了对嘧啶碱的吸引能力，因而从凈电荷考虑所推测出来的洗脱次序必須加以修改。因此为了說明所观察到的分离情况(图 17)，必須假定交换剂吸附嘌呤碱的能力約三倍于吸附嘧啶碱的能力[60]。

Cohn 和 Khym[62] 曾詳細叙述了四个戊糖核苷酸的分离（混合的-2′- 和 -3′-磷酸）。图 18 表示出一个在 pH 2.5 时用稀盐酸作洗脱的典型层析譜。

阴离子交换树脂(Dowex-1 或 -2, Amberlite-IRA-400 或 -410, 200～400 网眼，8～10% 的二乙烯基苯)是以氯化物型使用。交换柱是用适量的交换剂以糊状注入到一个含有粗的熔結玻片的玻管中构成[56]。交换柱的最

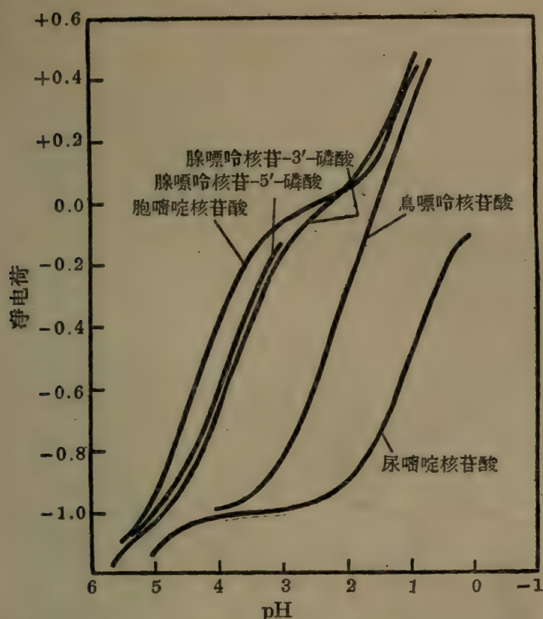


图 16 每个核糖核苷酸分子上的电荷与 pH 的关系
(W. E. Cohn: *J. cell. comp. Physiol.* 1951, 38 补充本 1, 24 頁)

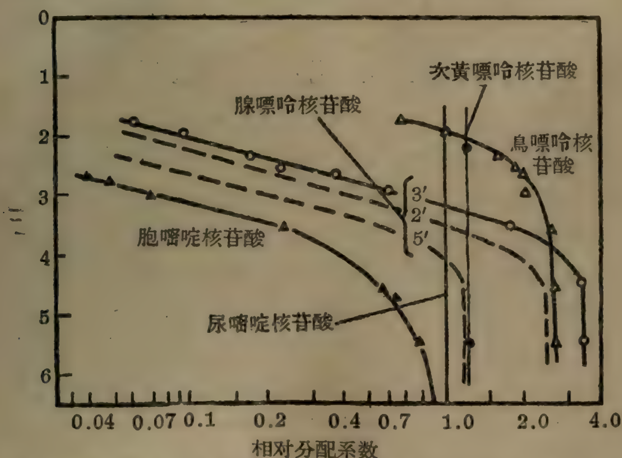


图 17 核糖核苷酸的相对分配系数(洗脱峰的位置)的观察值与 pH 的关系
〔W. E. Cohn: *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff 和 J. N. Davidson): Academic Press, New York 1955, 223 頁〕

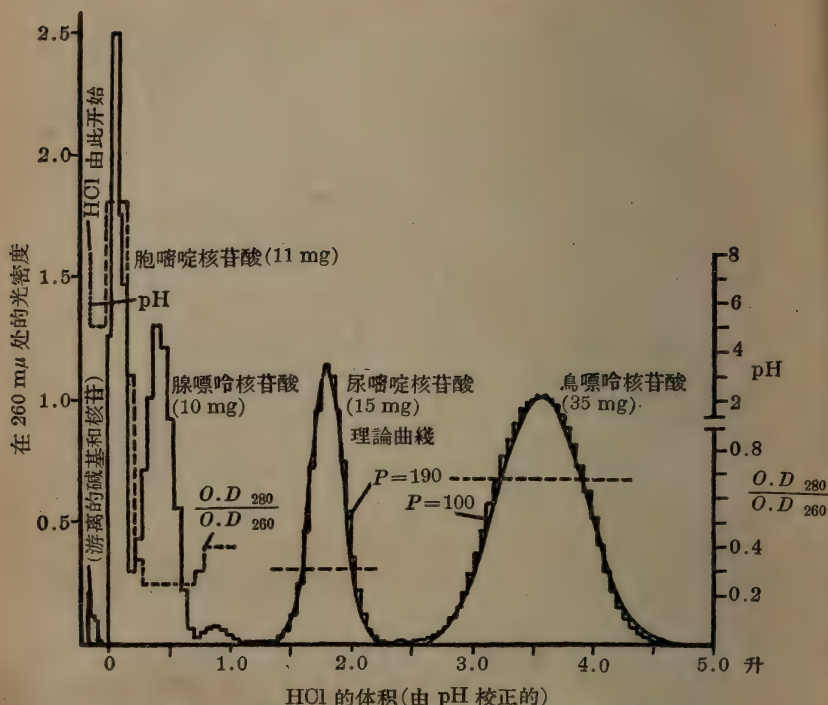


图 18 用阴离子交换(Dowex-2-氯化物)分离核糖核苷酸
連續綫代表計算的理論曲綫
(W. E. Cohn: *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, 1476 頁)

低高度应为 10 cm，而所含树脂的最小体积应該是：每克混合的核苷酸应有 20 ml。一个更高和更大容量的交换柱将增加分离的量，然而将延緩操作的速度。树脂的制备是将 10 个柱容量(CV)的 1*N* 氢氧化鈉溶液、2 个 CV 的 1*M* 氯化銨溶液、10 个 CV 的 1*N* 盐酸溶液和 2 个 CV 的水(使流出液的 pH 大于 3)流过树脂。当戊糖核酸被碱水解后(参看上面)，溶液用氢型的磺酸-聚苯乙烯离子交换剂(Dowex-50 或 Amberlite-IR-120)[63] 滴定至 pH 5，而交换剂則借过滤或傾出的方法除去。将交换剂洗滌，洗液并入濾液中，然后加氨使濾液的 pH 提高到 8 以上。再将濾液稀釋，使总阴离子(包括核苷酸)的濃度变为 0.01*M*，然后将其以不大于 3 毫升/平方厘米/分的流速流过交换剂，使阴离子吸附在交换剂上。交换柱用 2 CV 的水和 10～20 CV 的 0.01*M* 氯化銨溶液洗滌(直到流出液的 pH 降至 7 以下)以除去核苷、嘌呤碱和嘧啶碱。若水解产物中有无机磷酸盐存在，則应該先用 0.04 *M* 氯化銨溶液 (10

CV)，继之用 2 CV 水洗滌[64]。

用稀盐酸 (0.002 N) 洗脱核苷酸，其洗脱过程可用分光光度法测定洗脱液在 260 mμ 处的光吸收来追踪。胞嘧啶核苷酸在最初的 10 CV 內被除去，继之則腺嘌呤核苷酸被除去(約在 30 CV 內出現)。当洗脱液的光密度值重新降至低于 0.01 时，用約 100 CV 的 0.005 N 盐酸按尿嘧啶核苷酸和鳥嘌呤核苷酸的次序来洗脱。核苷酸的分离也可以在甲酸盐交换柱(在开始时的几个步驟中用甲酸盐代替氯化物)上用 0.1 M 甲酸来进行或在乙酸盐交换柱(在开始时的几个步驟中用乙酸盐代替氯化物)上用 0.3M 乙酸来进行[62]。

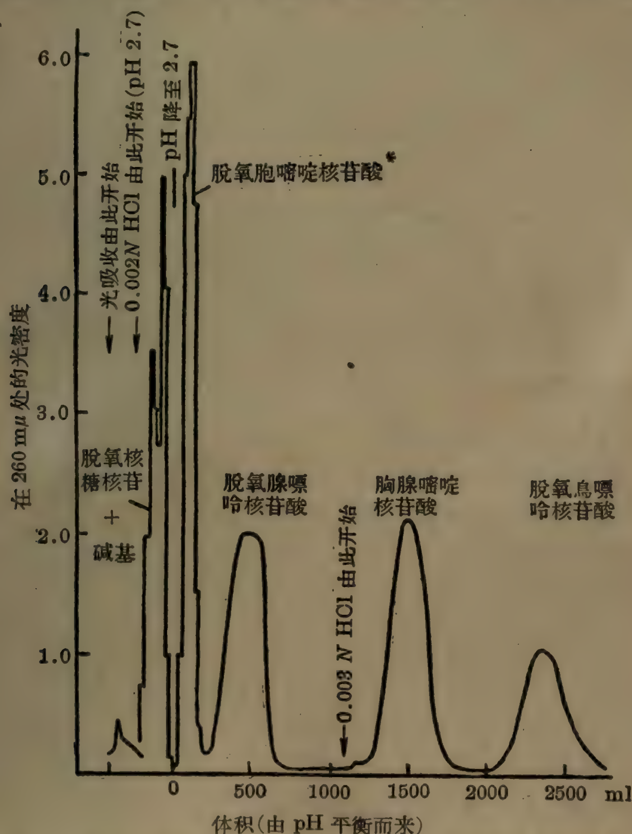


图 19 用阴离子交换方法(Dowex-1-氯化物)分离脱氧戊糖核苷酸
(E. Volkin, J. X. Khym 和 W. E. Cohn: *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, 1534 頁)

---

* 原文誤，已改正(譯者注)

Volkin、Khym 和 Cohn[52] 首先叙述了脱氧戊糖核酸經酶消化后所产生的脱氧戊糖核苷酸(-5′-磷酸)的分离。其典型的层析譜見图 19。脱氧戊糖核苷酸的分离[52, 65~67] 和戊糖核酸的分离相类似，其中只是胸腺嘧啶脱氧戊糖核苷酸（胸腺嘧啶核苷酸）代替了尿嘧啶核苷酸。Cohn、Volkin 和 Khym[68] 对这个方法曾作了全面的描述。

将 0.1~1.0% 的脱氧戊糖核酸溶液在水浴上在 100°C 下加热 10 分钟，以除去其中的任何磷酸单酯酶[67]，然后使溶液中硫酸镁(Mg: P=1:10)的濃度达到 0.03 *M* 以及結晶核糖核酸酶的濃度为 0.02%[68]，再在 37°C 下保温。在保温时逐滴加入稀氫氧化鈉溶液使 pH 保持在 6~8 之間。經过 1~2 小时后，将制自响尾蛇毒的二酯酶[69]加入其中，并調节 pH 至 8 和 9 之間。水解作用在 5~6 小时內完成。在水解过程中将溶液用稀氫氧化鈉溶液滴定，使 pH 保持不变。水解完全后，加入氫氧化銨使溶液的濃度变为 0.1 *M*，然后将溶液稀釋，使总的阴离子濃度（包括核苷酸）小于 0.01 *M*，并使其在交換剂上吸附。和层析戊糖核苷酸一样，这个层析是在氯化物型柱上进行。經在柱上吸附并如前洗滌后，用約 50 CV 的 0.001 *N* 盐酸洗脱脱氧胞嘧啶核苷酸，并用 40 CV 的 0.002 *N* 盐酸洗脱脱氧腺嘌呤核苷酸。胸腺嘧啶核苷酸則用 30 CV 的 0.003 *N* 盐酸洗脱，而脱氧鳥嘌呤核苷酸用 0.005 *N* 的盐酸(約 70 CV)洗脱。这个层析也可以使用甲酸盐或乙酸盐的层析柱。

戊糖核酸碱水解产物的离子交換层析的最重要結果之一是核苷 -2′- 和 -3′-磷酸异构体的发現和分离[60, 70, 71]。核苷 -5′-磷酸不能用化学水解制得。核苷 -2′- 和 -3′-磷酸的发現对戊糖核酸結构的解釋以及对戊糖核酸碱水解机制的理解均有重大的帮助（参看第八章）。

已經測定了腺嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸这两个酸的异构体的解离常数（参看第七章，表 9），其氨基的 pK_a' 值和二級磷酸解离的 pK_a' 值依 5′-、2′- 和 3′- 的次序而减小。旣然在必要的分离条件下，异构体在洗脱时呈現这样的次序，这似乎是，因为异构体的其他因素几乎不变，那么这些基团的解离就构成了分离的原因[55]。

腺嘌呤核苷-2′-磷酸(腺嘌呤核苷酸 a) 和腺嘌呤核苷-3′-磷酸

(腺嘌呤核苷酸 b) 可以用氯化物[60, 70]、甲酸盐[54]或乙酸盐的层析系統加以分开(图 20)。在这些系統中經常采用甲酸盐系統，其原因一部分是由于易获得 pH 3～4 的緩冲溶液，另一部分是由于甲酸及其銨盐容易揮发。但是，如果用再吸附和洗脱进行濃縮，則采用稀盐酸具有无需稀釋的便利，而濃的甲酸盐和乙酸盐溶液在再吸附前就必須加以稀釋[60, 72]。将最初分离所得的腺嘌呤核苷酸再吸附在同一柱上，每毫升柱所吸附的腺嘌呤核苷酸最好是 2 mg，而总的阴离子濃度(包括核苷酸)不宜大于 0.01 M。将层析柱按前法洗滌，而腺嘌呤核苷酸的异构体則用 150 CV 的 0.02 N 盐酸加以洗脱[62]。腺嘌呤核苷-2′-磷酸約在用了 45 CV 后出現，在 70 CV 时則达到頂峰，而腺嘌呤核苷-3′-磷酸則在約 120 CV 时达

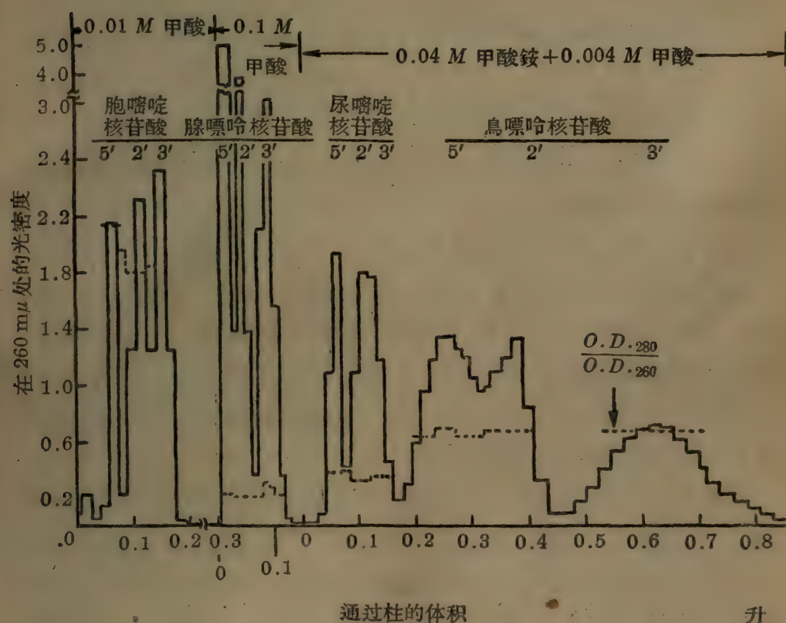


图 20 用阴离子交换方法(Dowex-1-甲酸盐)所作的 -2′-、-3′- 和 -5′-核糖核苷酸异构体的分离

〔W. E. Cohn: *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff 和 J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, 230 頁〕

到頂峰。胞嘧啶核苷-2′-和-3′-磷酸可用类似的方法用 0.001 *M* 盐酸[62] 或一个甲酸盐或乙酸盐系統[50, 54, 60, 70] 加以分离；尿嘧啶核苷-2′-和-3′-磷酸可用 0.05 *M* 甲酸銨和 0.00125 *M* 甲酸在甲酸銨柱上分离[50, 54, 60, 70]，鳥嘌呤核苷-2′-和-3′-磷酸則用 0.005*N* 盐酸在氯化物柱上分离[54, 60, 62, 70]。所分离的异构体則从稀溶液中在更小的柱上用再吸附的方法进行濃縮，并洗脫在小量的 0.1 *N* 盐酸中[62]。

离子交換的分离方法也可以应用于核苷二磷酸、寡核苷酸以及如在第三章中所叙述的应用于核酸。为了促进分离，亦曾采用絡合剂。在这些絡合剂中最有效的是硼酸，它常以四硼酸盐($K_2B_4O_7$)的状态存在于溶液中。采用硼酸盐系統可以显著地增加核苷的吸附[55, 73]。核苷酸以及核苷酸异构体的分离也可以在硼酸盐系統中进行而得到一些分离上的改进[74~76]。

水解产物的紙层析分离

自从 Vischer 和 Chargaff[77] 以及 Hotchkiss[4] 第一次証实可用紙层析方法分离核酸中的組分后，这个方法进展得很快，并且普遍用作定量的分析方法。这个方法具有比离子交換方法使核酸組分分离得更快的优点，虽然它很少应用于大量物质的分离。已經討論过在核酸中存在着酸-碱基团的組分，这些組分能促进它們本身的吸附。应用紙层析技术时需要克服的主要实驗困难是在紙上确定斑点的位置，因为这个方法的完全成功取决于用灵敏的和便利的方法来作斑点的鉴别。

早先的方法有賴于将核酸組分与汞构成絡合物，然后将其中的汞变成硫化汞而使核酸組分能被覺察[77]，其次也有賴于将紙任意剪开，借洗脫作用以及洗脫液的分光光度測定以估計濃度[4]。但这些方法都不十分令人滿意，前者麻煩而且相当不灵敏，后者則缺少分辨能力。随着在核酸組分的最大吸收范圍內高度发射的紫外灯的应用，核酸組分的鉴别有了显著的进展。于是在滤紙的螢光背景上，可看到核酸組分位置的黑暗区域[78~80]。在进行实驗时

要用一个低压的汞弧灯(能发射出它的輻射的 80%，为 254 mμ 的共振綫)和一块石英濾光片。另外一个比較費力但能供給一个持久的层析譜的眞实大小記录的方法，就是在紫外光下作一个层析譜的接触照相[81, 82]。所用的紫外光是經过濾光的，鈷和鎳的硫酸盐溶液与氯气曾用来分离从高压汞灯来的 254 mμ 和 265 mμ 譜綫[12]。曾有人声称利用鎘弧灯的 257 mμ 与 275 mμ 譜綫可以得到略高的灵敏度[83]。在显过影的片子上，物质的位置在深色的背景上显出白色的斑点;这些斑点因而可以自行描繪在层析譜上。

照相的方法也可以当作一个非常灵敏的方法用以檢出象鳥嘌呤及其衍生物一样的物质的斑点，这些物质在某种情况下产生螢光[84, 85]。这个方法亦曾被用以檢出从用 8-偶氮鳥嘌呤处理后的有机体中提取出来的戊糖核酸的不同样品中存在的小量 8-偶氮鳥嘌呤核苷酸[86, 87]。此效应可以在层析譜与照相紙之間嵌入一張纤維素硝酸酯片予以照相記录。

适用于核苷酸以及其他磷酸酯的其他檢定方法是用酸性鉬酸盐溶液作紙层析譜的噴洒，用热、光或酶使酯发生局部水解以及使所生成的磷鉬酸絡合物还原成藍色的化合物[88, 89]。避免需要使核苷酸水解的方法包括用鈾[90]及用鉄离子[91]的固定作用。亦可用不同的糖基以檢出核苷[92]。用过碘酸盐将戊糖氧化成二醛，然后再用 Schiff 試剂檢出所生成的二醛亦能檢出戊糖核苷。脫氧戊糖核苷可用 Dische 二苯胺反应或用 Feulgen 反应来檢出。

Wyatt[93] 以及 Markham[94] 都曾叙述过层析分离的方法。虽然上行层析法对取得小型双向层析譜較为便利，但通常所用的是下行层析法，这样溶剂就可以流出濾紙之外。Whatman No. 1 濾紙适宜于多种目的的应用，但应用于制备的工作，則更厚的 No. 3 MM 濾紙更为可取。为了要作定量分析，在每个斑点内，每一嘌呤或每一嘧啶的含量必須約为 50 μg 或其相当的量，虽然更小的量也曾成功地被使用过。产生一个斑点最好用 10～15 μl 的溶液。应当取与試驗斑点在同一平面上的平行徑路作为空白。在用分光光度法測定濃度以前，空白与試驗斑点都要用 5 ml 的 0.1 N 盐酸

溶液萃取过夜。

虽然溶剂的选擇还略受这样的事实所限制，即在紫外光下有吸收的物质不能使用，但在紙层析中仍曾經采用过許多种的溶剂系統。但是大多数溶剂系統都是以脂肪醇为基础的，因为它們可以在中性、酸性或碱性的情况下使用。一个重要的因素是溶剂中存在的水的相对量；例如，改变正丙醇-水混合物的水含量时，在层析譜上的腺嘌呤和腺嘌呤核苷酸的相对位置就可被顚倒[82]。由于这个緣故，必須用固定的水濃度，通常是恰在飽和之下，而不是一个飽和溶液，这样水的濃度就与温度无关。其他影响分离的因素是 pH 与离子强度。核酸組分的电离将改变分配的情况而有利于水相，因此 pH 的控制是重要的。改变盐濃度的主要影响是对水和有机溶剂的互溶，可是溶质的溶解度也会受到影响，而且增加了溶质的吸附。含氨或不含氨的正丁醇水溶液是最初用以分离核酸組分的溶剂中的一个[4, 95]，并且仍为最有用的一个。氨最好加入到槽底的溶剂中，因为这样能保持更恒定的状态。用这个溶剂系統，在核酸中所发現的全部嘌呤碱和嘧啶碱均能彼此分离开来。但是，这个系統对鳥嘌呤的容量则低。对含有相当高鳥嘌呤濃度的混合物宁可采用酸性系統。与盐酸在一起的叔丁醇[6]或异丙醇[28]都可应用。

下面列出一个可用于实現大多数分离的溶剂的目录[94]；在某些实例中，溶剂的組成不是完全和文献中所报道的一样，因为 Markham[94] 曾对它們作了修改。

1. 正丁醇(860 ml)，水(140 ml)[4, 82]。

2. 与溶剂 1 相同，同时有氨(比重0.880的氨水的体积以5%計)加于槽底的液体中。

3. 正丁醇(770 ml)，水(130 ml)，98～100% 的甲酸(100 ml)[82]。

4. 叔丁醇(700 ml，在 26°C)，恒沸点盐酸(132 ml)，在20°C下加水到 1 升[6, 12, 84, 96～98]。

5. 异丙醇(680 ml)，濃盐酸(164 ml，比重1.19)，加水到

1 升[28]。

6. 异丙醇 (700 ml)，水 (30 ml)，另加比重为 0.880 的氨溶液(每升槽容量加 0.35 ml)[99]。

7. 饱和硫酸銨水溶液 (800 ml)，1 M 醋酸鈉 (200 ml)，异丙醇 (20 ml)[12]。

前三个溶剂适用于嘌呤碱，嘧啶碱和核苷；但是溶剂 2 不适用于作鳥嘌呤的定量分析，它最好用溶剂 3 或 5 进行分析。溶剂 3 对核苷特别有用。核苷酸在所有前三个溶剂中极少移动而仍靠近原点。溶剂 4 适宜于研究酸水解产物，并且能使鳥嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸分离。溶剂 5 曾被广泛应用于核酸的酸水解产物和碱水解产物，其中所有的碱基都可被分离。这个溶剂特别被推荐用于含有高濃度鳥嘌呤的混合物的分离。这个溶剂亦能使核苷、单核苷酸以及小的寡核苷酸分离[28, 100~110]。Laland、Overend 和 Webb[17, 29] 应用了一种类似的酸溶剂，但使用了正丁醇(正丁醇, 0.5 N 盐酸, 2-甲氧基乙醇，其体积之比为 30:17:10)。溶剂 6 可使小的寡核苷酸与单核苷酸分离，它們都是以 -2′- 或 -3′- 的形式存在。溶剂 6 亦曾应用于使脱氧戊糖二核苷酸与二核苷一磷酸分离[99, 104]。Brown 和 Todd 及其同工者亦应用这个溶剂使环状单核苷酸[111]与核苷酸酯分离[112]。溶剂 7 对于从核苷-2′-磷酸中分出核苷-3′-磷酸特别重要；只要嘌呤或嘧啶带有一个氨基，这种分离就能完成(尿嘧啶核苷酸的异构体不能分开)。这个溶剂也能使环状 -2′, 3′-磷酸从 -2′- 或 -3′-磷酸中分出[12]。

对于一个混合物用单向层析法分离感到太复杂时，可用一个有用的双向层析系統，这个系統系由异丙醇-盐酸溶剂与正丁醇-氨溶剂或与异丙醇-氨溶剂合并組成而加以使用。

应用溶剂 1,2,3 和 5[93, 94] 时的嘌呤碱、嘧啶碱和核苷的 R_F 值 $\left(R_F = \dfrac{\text{色带的移动}}{\text{液体前沿的移动}}\right)$ 列在表 4。随着温度的改变必須預期到在数值上有某些差别。表 5 列出核苷酸在溶剂 4, 5 和 7 中的 R_F 值。Carter[80] 用磷酸鈉-异戊醇系統(no. 8)分离核苷酸异构体所

表 4 嘌呤碱、嘧啶碱和核苷的 R_F 值

	溶		剂	
	1	2	3	5
腺嘌呤	0.38	0.28	0.33	0.32
鳥嘌呤	0.15	0.11	0.13	0.22
次黃嘌呤	0.26	0.12	0.30	0.29
黃嘌呤	0.18	0.05	0.24	0.21
尿嘧啶	0.31	0.19	0.39	0.66
胸腺嘧啶	0.52	0.35	0.56	0.76
胞嘧啶	0.22	0.24	0.26	0.44
5-甲基胞嘧啶	0.29	0.27	—	0.52
5-羥甲基胞嘧啶	0.13	0.12	—	0.44
腺嘌呤核苷	0.20	0.22	0.12	0.34
鳥嘌呤核苷	0.15	0.03	0.17	0.30
次黃嘌呤核苷	—	0.03	—	0.30
尿嘧啶核苷	0.17	0.08	0.25	0.64
胞嘧啶核苷	0.12	0.11	0.18	0.45
腺嘌呤脫氧戊糖核苷	0.35	—	—	—
鳥嘌呤脫氧戊糖核苷	0.21	—	—	—
次黃嘌呤脫氧戊糖核苷	0.23	—	—	—
尿嘧啶脫氧戊糖核苷	0.38	—	—	—
胸腺嘧啶脫氧戊糖核苷	0.51	0.40	—	0.81
胞嘧啶脫氧戊糖核苷	0.23	—	—	0.60
5-甲基胞嘧啶脫氧戊糖核苷	0.25	—	—	—

〔G. R. Wyatt: *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff 和 J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, 252 頁; R. Markham, *Brit. med. Bull.* 1954, **10**, 216 頁〕

表 5 核苷酸的 R_F 值

<table>
<tr><th></th><th colspan="4">溶 剂</th></tr>
<tr><th></th><th>4</th><th>5</th><th>7</th><th>8</th></tr>
<tr><td>腺嘌呤核苷-2′-磷酸</td><td rowspan="2">0.50</td><td rowspan="2">0.48</td><td>0.26</td><td>0.74</td></tr>
<tr><td>腺嘌呤核苷-3′-磷酸</td><td>0.16</td><td>0.67</td></tr>
<tr><td>鳥嘌呤核苷-2′-磷酸</td><td rowspan="2">0.46</td><td rowspan="2">0.43</td><td>0.50</td><td rowspan="2">0.79</td></tr>
<tr><td>鳥嘌呤核苷-3′-磷酸</td><td>0.40</td></tr>
<tr><td>尿嘧啶核苷酸</td><td>0.80</td><td>0.77</td><td>0.73</td><td>0.85</td></tr>
<tr><td>胞嘧啶核苷酸</td><td>0.56</td><td>0.58</td><td>0.73</td><td>0.85</td></tr>
<tr><td>腺嘌呤核苷-5′-磷酸</td><td>—</td><td>0.43</td><td>—</td><td>0.69</td></tr>
<tr><td>脫氧胞嘧啶核苷酸</td><td>—</td><td>0.64</td><td>—</td><td>—</td></tr>
<tr><td>胸腺嘧啶核苷酸</td><td>—</td><td>0.81</td><td>—</td><td>—</td></tr>
</table>

〔摘自 G. R. Wyatt: *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff 和 J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, 256 頁〕

得的数値亦包括在表5內。这个溶剂包含用异戊醇飽和的5%磷酸氫二鈉溶液。在这个系統中用0.5%的十二胺的正戊醇溶液代替异戊醇曾更有效地分开了混合的腺嘌呤核苷酸[113]。

水解产物的电泳分离

核酸以及核酸組分中的可电离基团的数目和种类已經在牵涉到它們在离子交换柱上和紙上的吸附时論及。在某一給定pH时，組分所带的凈电荷不同使組分在电場中以不同的速度移动，因此組分的分离就成为可能。这个方法的重要特点在于，在某一給定pH时，可以相当准确地推測出組分的相对迁移率，因而就能够鉴别組分。

Gordon和Reichard[114]首先尝試用电泳分离由酶促水解所得的核酸組分。他們用琼脂凝胶作为支持介质。可是琼脂凝胶并不是一个十分适用的物质，因而以后所有的工作几乎都在紙上进行。电泳分离法不象紙层析法那样被广泛地应用。它主要用于核苷酸、小的寡核苷酸以及核苷酸异构体的分离。电泳分离法可能提供了在一次实驗中能够从戊糖核酸中分离4个碱基的最佳方法之一[93]。

可以应用紙电泳的标准方法来分离核酸的水解产物。但是Markham和Smith[99, 115]与Crestfield和Allen[116]都曾描述过专門用于核酸組分分离的易行技术。

对电泳分离具有重要意义的解离基团为磷酸的一級和二級解离基团以及鳥嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶的氨基。分离极少能在使—NH—CO—以及糖羥基解离的濃的碱溶液中进行。腺嘌呤核苷酸、鳥嘌呤核苷酸、胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸的分离根据是氨基的pK'_a值的不同(参看第七章，表9)，这些pK'_a值是在2到5之間。在这个pH范圍內，一級的磷酸基团完全解离，而二級磷酸基团几乎全部不解离。适宜于分离的pH值是3.5。在这个pH时，腺嘌呤核苷酸的氨基解离度是0.54，鳥嘌呤核苷酸的氨基解离度是0.05，胞嘧啶核苷酸的氨基解离度是0.84(图16)，而尿嘧啶核苷酸不带有氨基。因为每个核苷酸因含有充分解离的磷酸

基团而带有一个单位負电荷，因此凈負电荷是：腺嘌呤核苷酸为0.46，鳥嘌呤核苷酸为0.95，胞嘧啶核苷酸为0.16和尿嘧啶核苷酸为1.00。核苷酸通过液体的阻力是它們的分子大小与形状的函数。由于这些函数几乎是相同的，因此上面的数值应为在这个pH时的核苷酸的相对迁移率。借助解离曲綫(图16)，可以計算出在任何其他pH时的相对迁移率。核苷酸的迁移率能够决定它在电泳过程中沿着紙在两电极間移动的距离；因此在pH 3.5时，可以很容易地把核苷酸的混合物分开成为四个具有明显界限的斑点[115,117~120]。

图21 A 表示出核糖核苷-3′-磷酸*的分离，这种分离是在pH 3.5、离子强度为0.1的甲酸盐緩冲液中用一个30 V/cm的电場电泳1小时完成的。Crestfield和Allen[120]亦指出上面的分离也能在pH 9.2时利用尿嘧啶核苷酸和鳥嘌呤核苷酸的—NH—CO—解离而得以完成(图21，B)。这样的分离应归因于尿嘧啶核苷酸的烯醇型基团的更低的pK'_a值以及核苷酸重量間的差別。

Davidson及其同工者[117,121]仅能部分地将核苷-2′-，-3′-和-5′-磷酸分离，可是Crestfield和Allen[120]已能将每一个-5′-磷酸从相应的-2′-和-3′-磷酸分出，并且也能将-2′-与-3′-磷酸分开。-5′-磷酸在核糖部分带有两个相邻的羥基，而-2′-和-3′-磷酸則沒有相邻的羥基。四硼酸根离子与带有邻位羥基的糖間的絡合反应是人所熟知的[122]，这个反应一般在pH 9.2的四硼酸鈉溶液中发生。所成的絡合物是一个較硼酸为更强的酸，因此在pH 9.2时带有一个高的凈負电荷[123]。所以在四硼酸盐的緩冲液中，-5′-磷酸的迁移率比相应的-2′-和-3′-磷酸的迁移率为大。象在图21 C至F所示的[120,123]，这是实在的情况。-2′-和-3′-磷酸的氨基的解离常数非常接近，可是它們的磷酸二級解离的数值却有显著的差別(第七章，表9)。这些异构体的分离似乎是在解离作用达到一半完成时的pH值时发生[124]，而Crestfield和Allen[120]曾满意地在pH 6的地方分离了嘧啶核苷酸的异构体(图21，I和

* 原文誤，已改正(譯者注)

J)。虽然可以从异构体上所計算出的净电荷来預期分离，但是，在pH 6的地方，不能把嘌呤核苷酸的异构体分离。Crestfield 和 Allen[120] 将这种性质归因于两个异构体間的空間排列的差异，这个差异抵消了电荷的差别。可是在 pH 8 时仍能实現腺嘌呤核苷酸异构体的分离(图 21, G)。鳥嘌呤核苷酸的异构体既不在 pH 6 时分开，亦不在 pH 8 时分开，而只能在 pH 3.8 的甲酸盐緩冲液中分开[120]。

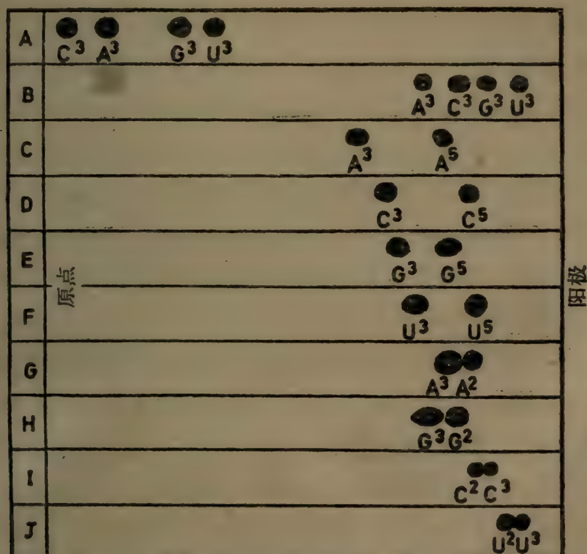


图 21 用紙电泳分离核糖核苷酸异构体（A、G、C 和 U 指腺嘌呤核苷酸、鳥嘌呤核苷酸、胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸）

A. 甲酸盐緩冲液，pH 3.5； B~F. 0.1 *M* 四硼酸鈉溶液，pH 9.2；
G. 0.1 *M* 碳酸氫鈉溶液，pH 8； H. 甲酸盐緩冲液，pH 3.8；
I. 磷酸盐緩冲液，pH 6.2； J. 磷酸盐緩冲液，pH 5.8

(A. M. Crestfield 和 F. W. Allen: *Analyt. Chem.* 1955, **27**, 424 頁)

既然核苷酸的分离主要是通过氨基解离的不同而得到实現，那么核苷类、嘌呤碱和嘧啶碱必然亦能用类似的方法加以分开，因为，它們的解离常数虽然不与相应的核苷酸的解离常数相等，可是氨基的解离仍有差异[125]。但是分离这些物质的尝試很少进行，大概是因为它們能够很容易地用层析方法加以分开。在 pH 3.5 时，

除沒有氨基的尿嘧啶核苷和尿嘧啶不帶有正电荷外，其他的鹹基和核苷均帶有正电荷，因此可以預料到它們与核苷酸移向阳极的方向相反而向阴极移动。但是，这些物质的唯一的电泳研究指出，在 pH 3.2 时鹹基的迁移并不是象我們所預料的[126]。核苷亦能在 pH 9.2 时与四硼酸盐絡合，而被滿意地分开[127]。

核酸局部断裂成为核苷酸和小分子量的多核苷酸可以用化学水解和酶促水解的方法来实現。这种含有多达 30 种不同物质的混合物是不能单独用电泳来进行直接分开的。但是若先用紙层析进行分級分离，然后再用电泳来分开每个級分，就能够实現这种复杂混合物的完全分离。Markham 和 Smith[104, 115, 125] 曾研究了多核苷酸的电泳迁移率，他們介紹了一个計算小分子量多核苷酸的相对迁移率的方法（通常对尿嘧啶核苷酸为 1.00 而言），这种方法大大便利了在复杂的混合物中識别这些物质。一个具有双倍于单核苷酸的电荷与大小的二核苷酸不具有象单核苷酸一样的电泳迁移率，因为分子通过流体的移动阻力不是它的大小的直接函数。核苷酸是不对称的分子。从扩散数据[114]知道它們所具的軸比似乎約为 5:1，因而一个核苷酸将有一个在 2.5:1 与 10:1 之間的軸比。应用这两个极限并假定它們对移动的阻力是与在平移扩散中的相同，則得到的二聚体对单体的摩擦阻力之比是在 1.32 与 1.85 之間。在 pH 3.5 时，經过內滲流动（endosmotic flow）校正后的尿嘧啶核苷酸的单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸在紙上所观察到的相对迁移率为 1:1.4:1.5[104]。在这个 pH 时，核苷酸的淨电荷分别为 1、2 和 3，因此若将单核苷酸的移动摩擦阻力作为 1，則二核苷酸的摩擦阻力将为 2/1.4=1.43，而三核苷酸的摩擦阻力将为 3/1.5=2。从这些数值以及从解离曲綫所得到的淨电荷值可以計算出在任何 pH 值时的任何单核苷酸、二核苷酸或三核苷酸的迁移率。例如，若以 A、G、C 和 U 分别代表腺嘌呤核苷酸、鳥嘌呤核苷酸、胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸的殘基，則在 pH 3.5 时的迁移率如下：

AG=(0.46+0.95)/1.43=0.99 倍于尿嘧啶核苷酸的迁移率

AC=(0.46+0.16)/1.43=0.43 倍于尿嘧啶核苷酸的迁移率
AAU=(0.46+0.46+1.0)/2=0.96 倍于尿嘧啶核苷酸的迁移率
在作这些計算时需要假定不同单核苷酸的分子具有相同的大小和形状，而且二核苷酸和三核苷酸也象单核苷酸一样，具有相同的解离常数。Markham 和 Smith[104] 曾証实了这个方法的可靠性，他們注意到十九种单核苷酸和多核苷酸的相对迁移率的計算值与观察值有一个很好的直綫关系。Markham 和 Smith 还广泛地应用了这个方法来研究戊糖核酸[99,104,115] 和脱氧戊糖核酸[107,108] 的酶促水解产物。

显然，一类核苷酸的单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸的相对迁移率的数值能够构成一个收斂級数 (converging series)，因此分离四核苷酸和更高級的多核苷酸是不可能的。但是，当用弱碱水解戊糖核酸[99]时以及核糖核酸酶作用于戊糖核酸时[99,105,115]所生成的极小量的环状二核苷酸可用这种方式分离出来。

嘌呤碱和嘧啶核苷酸的化学分級分离

象先前所述的，在 100°C 时用 1 N 酸水解戊糖核酸 1 小时可得到嘌呤碱和嘧啶核苷酸的混合物。嘌呤碱在酸液中生成极难溶解的銀盐，而嘧啶核苷酸則否，因而就能把水解产物分开[13]。若将嘌呤碱再溶于稀盐酸中，而嘧啶核苷酸部分，在除去銀离子后，用前列腺的磷酸单酯酶(prostatic phosphatase)处理，則得到两种混合物，一种含有腺嘌呤和鳥嘌呤，而另一种含有胞嘧啶核苷和尿嘧啶核苷。每一对中的个别組分的紫外吸收光譜都有足够的差别，以致可用分光光度测定法測定每个組分的濃度[13,128]。这种分級分离虽然是一种广泛应用的碱基分析方法，但它本身并不适合于作組分的分离。

核酸的組成

核酸样品中的核苷酸成分的比例可用剛才叙述的一个或另一

表 6　一些脱氧戊糖核酸的組成成分；在水解物中每 100 克原子磷的克分子比，已对 100% 回收作过校正

組　織	腺嘌呤	鳥嘌呤	胞嘧啶	5-甲基胞嘧啶	胸腺嘧啶	$\frac{AD}{THY}$	$\frac{GU}{CY+MCY}$	$\frac{AD+THY}{GU+CY+MCY}$	实际回收 %
小牛胸腺[131]	27.3	22.7	21.6	—	28.4	0.96	1.05	1.26	93.7
小牛胸腺[25]	28.0	23.5	20.4	—	28.1	1.00	1.15	1.28	100.2
小牛胸腺[16]	29.2	20.8	20.8	—	29.2	1.00	1.00	1.40	96.0
小牛胸腺[28]	28.2	21.5	21.2	1.3	27.8	1.02	1.01	1.27	90.0
小牛胸腺[29]	28.0	20.9	21.4	1.9	27.8	1.01	0.96	1.26	91.0
小牛胸腺[67]	27.4	21.4	21.0	1.1	29.1	0.94	0.97	1.30	99.6
牛脾[30]	27.9	22.7	20.8	1.3	27.3	1.02	1.02	1.23	100.0
牛脾[67]	27.7	22.1	21.8	—	28.4	0.97	1.01	1.28	98.0
牛肝[132]	28.8	21.0	21.1	—	29.0	0.99	1.00	1.37	94.1
牛胰[67]	27.8	21.9	21.7	—	28.5	0.97	1.01	1.29	97.8
牛腎[25]	28.3	22.6	20.9	—	28.2	1.00	1.08	1.30	96.9
牛精[28]	28.7	22.2	20.7	1.3	27.2	1.05	1.01	1.26	90.0
羊胸腺[132]	29.3	21.4	21.0	—	28.3	1.03	1.02	1.36	94.3

羊肝[132]	29.3	20.7	20.8	—	29.2	1.00	1.00	1.41	89.9
羊脾[25]	28.0	22.3	21.1	—	28.6	0.98	1.06	1.30	92.9
羊精[28]	28.8	22.0	21.0	—	27.2	1.06	1.05	1.27	88.5
人胸腺[132]	30.9	19.9	19.8	—	29.4	1.05	1.00	1.52	94.6
人肝[132]	30.3	19.5	19.9	—	30.3	1.00	0.98	1.53	95.4
人脾[67]	29.2	21.0	20.4	—	29.4	0.99	1.03	1.42	96.6
人精[133]	30.9	19.1	18.4	—	31.6	0.98	1.04	1.67	96.0
鯡魚精[28]	27.8	22.2	20.7	1.9	27.5	1.01	0.98	1.23	91.0
鮭魚精[134]	29.7	20.8	20.4	—	29.1	1.02	1.02	1.43	94.2
Abacia lixula 精[135]	31.2	19.1	19.2	—	30.5	1.02	1.00	1.61	94.2
Echinocardium cordatum 精[135]	32.9	17.0	17.9	—	32.2	1.02	0.95	1.86	96.4
Sarcina lutea[17]	13.4	37.1	37.1	—	12.4	1.08	1.00	1.02	—
麦胚[136]	27.3	22.7	16.8	6.0	27.1	1.01	0.99	1.19	96.2
酵母[69]	31.3	18.7	17.1	—	32.9	0.95	1.09	1.79	92.0
Pneumococcus 类型 III[25]	29.8	20.5	18.0	—	31.6	0.94	1.14	1.59	92.5
牛痘病毒[30]	29.5	20.6	20.0	—	29.9	0.98	1.03	1.46	100.0
T2r+ 噬菌体[30]	32.0	18.0	—	16.8*	33.3	0.96	1.07	1.88	97.0

* 5-羥甲基胞嘧啶

个方法进行测定。虽然别的方法也曾采用过，但最常用的方法是将从适当水解所得的嘌呤碱和嘧啶碱作紙上层析。这些分析方法曾被广泛地应用于分析从許多不同組織中所得到的核酸样品，其分析結果已由 Chargaff[129] 和 Magasanik[130] 列在表中。根据經常用不同方法制备不同制品的許多不同派别的工作者所作的实驗，对大量数据进行評价是困难的。但是，这些結果已經为我們在核酸知識的发展方面提供了极有意义的效果，卽来自不同来源的核酸的組成肯定存在着差异，这一点已經沒有什么怀疑了。

可是在脫氧核糖核酸不同級分的組成中所观察到的差异（第三章，表 1，第 50 頁）指出，核酸的整个組成幷不具有多大意义，除非十分肯定在提取过程中沒有分級分离发生。卽使能够肯定所制成的核酸样品是代表着細胞中的全部核酸，显然，它的組成若与代表着細胞中的单独生物单位的每一个单独級分的組成来比，将具有更小的意义。但是，表 1 所列的不同級分中的組成所具的差异若与不同来源的脫氧戊糖核酸的組成的差异相比，則这种差异幷不很大。因此后者的差异至今尙不能使不同細胞的全部分析表示該細胞特性的結論变为无效。

表 6 列出了从不同組織的脫氧戊糖核酸的分析中所得的代表数値。象 Chargaff[129] 已經指出的，在不同組織中似乎有三种主要类型的核酸，第一种核酸含腺嘌呤和胸腺嘧啶較多，第二种核酸的主要組成是鳥嘌呤和胞嘧啶，而第三种核酸則含有大致相同比例的所有四种組成。在絕大多数实例中，腺嘌呤对胸腺嘧啶的比率和鳥嘌呤对胞嘧啶的比率均非常接近于 1。这一观察的結果已被用来支持 Watson 和 Crick 所提出的双螺旋結构（参看第九章），在其中曾被假定有特殊的氫鍵連結着这两个碱基对。如果每一个腺嘌呤殘基都是这样地与胸腺嘧啶連結，而每一个鳥嘌呤也都是这样地与胞嘧啶連結，則它們之間之比将是 1。但是，从表 1（第 50 頁）中所列的 Bendich 及其同工者所得的数据看来，从小牛胸腺脫氧核糖核酸所得到的某些級分的比値与 1 有显著差别。由此可見，从核酸的整个分析所得到的这些比値为 1 的結果可能是偶然的，

而这种事实就不一定能够支持 Watson 和 Crick 的模型。

表 7 列出了几种戊糖核酸分析的某些特征数值。嘌呤碱对嘧啶碱的比率有显著的差别，而只有在比較少数的核酸中这个比率才似乎接近于 1。碱基的其他比率沒有列在表 7 中，因为这些比率很少是指細胞中的全部戊糖核酸，而它們是否有任何意义是值得怀疑的。Elson 和 Chargaff[138, 142~144] 发展了从病毒和組織中提取出全部戊糖核酸的技术，他們所得的一些結果列在表 23（第十二章，289 頁）。从表中可以看出腺嘌呤对尿嘧啶的比率和鳥嘌呤对胞嘧啶的比率虽然都不是 1，但在每个样品中却几乎相等。这个

表 7 一些戊糖核酸的組成成分；在水解物中每 100 克原子磷的克分子比，已对 100% 回收作过校正

組織	腺嘌呤	鳥嘌呤	胞嘧啶	尿嘧啶	$\frac{AD+GU}{CY+UR}$
面包酵母[18]	25.1	30.1	20.1	24.7	1.23
面包酵母[7]	25.7	28.1	21.8	24.4	1.16
面包酵母[137]	25.0	28.0	20.0	27.0	1.13
大腸杆菌[138]	27.0	27.5	23.0	22.5	1.20
兎肝[121]	19.3	32.6	28.2	19.9	1.08
鼠肝[121]	19.1	33.5	26.6	20.8	1.10
鼠肝[139]	19.0	34.0	30.2	16.8	1.13
羊肝[18]	20.4	39.4	25.8	14.4	1.49
人肝[18]	11.4	44.4	31.6	12.6	1.26
小牛肝[18]	21.6	40.6	23.3	14.5	1.65
小牛肝[140]	19.5	35.0	29.1	16.4	1.20
小牛胰[140]	14.2	48.6	23.8	13.4	1.69
小牛脾[140]	17.9	35.2	31.6	15.3	1.13
小牛胸腺[140]	18.5	43.9	25.6	12.0	1.65
烟草花叶病毒 (TMV)[91]	29.8	25.4	18.5	26.3	1.24
胡瓜病毒 (CV 3)[91]	25.7	25.5	18.2	30.6	1.05
番茄矮丛病毒 (BS)[141]	27.6	27.6	20.4	24.4	1.23
蕪菁黃化花叶病毒 (TY)[12]	22.6	17.2	38.0	22.2	0.66
南方菜豆花叶病毒 (SBM)[141]	25.9	25.9	23.0	25.2	1.07
馬鈴薯病毒 X (PX)[141]	34.4	21.4	22.8	21.4	1.27
Sarcina lutea[17]	16.7	28.4	32.9	22.0	0.82

結果的可能具有的意义将在十二章中討論。

前述的分析方法不仅使不同核酸的正确分析能够进行，同时还能发現新的核苷酸的存在，这些核苷酸一般只少量存在于核酸中，其中第一个被发現的是含有5-甲基胞嘧啶的核苷酸。5-甲基胞嘧啶是由 Johnson 和 Coghill[146] 应用經典的方法首先从核酸的水解产物中以苦味酸的形式分出的。这个5-甲基胞嘧啶存在于几种脫氧戊糖核酸中的事实現在已由层析分析方法加以証实[4, 28, 67, 136]（参看表6）。在噬菌体的脫氧戊糖核酸中含有大量的5-羥甲基胞嘧啶[30]。最近，在酵母核糖核酸的水解产物中发現一种新的、但还沒有被証实的核苷酸。就在这个核酸中，曾証明有N-甲基化的嘌呤碱和1-甲基鳥嘌呤存在[147, 148]。

（汪堃經 譯）

参考文献

[1] Hurst, R. O. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 1956, **34**, p. 265

[2] Levene, P. A. *J. biol. Chem.* 1922, **53**, p. 441

[3] Vischer, E. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1948, **176**, p. 715

[4] Hotchkiss, R. D. *J. biol. Chem.* 1948, **175**, p. 315

[5] Kerr, S. E., Seraidarian, K. and Wargon, M. *J. biol. Chem.* 1949, **181**, pp. 761, 773

[6] Smith, J. D. and Markham, R. *Biochem. J.* 1950, **46**, p. 509

[7] Loring, H. S., Fairley, J. L. and Seagran, H. L. *J. biol. Chem.* 1952, **197**, p. 823

[8] Jones, W. *Nucleic Acids* (2nd ed.): Longmans Green, New York, 1920, p. 107

[9] Abrams, R. *Arch. Biochem.* 1951, **30**, p. 44

[10] Levene, P. A. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* 1917, **15**, p. 21

[11] Thannhauser, S. J. and Dorfmüller, G. *Hoppe-Seyl. Z.* 1917, **100**, p. 121; 1919, **104**, p. 65; *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1918, **51**, p. 467

[12] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1951, **49**, p. 401

[13] Loring, H. S., Fairley, J. L., Bortner, H. W. and Seagran, H. L. *J. biol. Chem.* 1952, **197**, p. 809

[14] Loring, H. S. and Ploeser, J. McT. *J. biol. Chem.* 1949, **178**, p. 439

[15] Levene, P. A. and Bass, L. W. *Nucleic Acids:* Chemical Catalog

Company, New York, 1931, p. 57

[16] Marshak, A. and Vogel, H. J. *J. biol. Chem.* 1951, **189**, p. 597

[17] Dutta, S. K., Jones, A. S. and Stacey, M. *J. gen. Microbiol.* 1956, **14**, p. 160

[18] Chargaff, E., Magasanik, B., Vischer, E., Green, C., Doniger, R. and Elson, D. *J. biol. Chem.* 1950, **186**, p. 51

[19] Kossel, A. and Neumann, A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1893, **26**, p. 2753; *Hoppe-Seyl. Z.* 1896~97, **22**, p. 74

[20] Steudel, H. and Brigl, P. *Hoppe-Seyl. Z.* 1910~11, **70**, p. 398

[21] Feulgen, R. *Hoppe-Seyl. Z.* 1917~18, **101**, p. 296

[22] Tamm, C., Hodes, M. E. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1952, **195**, p. 49

[23] Tamm, C., Shapiro, H. S. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1952, **199**, p. 313

[24] Tamm, C., Shapiro, H. S., Lipshitz, R. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1953, **203**, p. 673

[25] Daly, M. M., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E. *J. gen. Physiol.* 1950, **33**, p. 497

[26] Gold, N. I. and Sturgis, S. H. *J. biol. Chem.* 1952, **196**, p. 143

[27] Hershey, A. D., Dixon, J. and Chase, M. *J. gen. Physiol.* 1953, **36**, p. 777

[28] Wyatt, G. R. *Biochem. J.* 1951, **48**, p. 584

[29] Laland, S. G., Overend, W. G. and Webb, M. *J. chem. Soc.* 1952, p. 3224

[30] Wyatt, G. R. and Cohen, S. S. *Biochem. J.* 1953, **55**, p. 774

[31] Levene, P. A. *J. biol. Chem.* 1918, **33**, p. 425; 1919, **40**, p. 415

[32] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1911, **44**, p. 1027

[33] Bredereck, H. and Richter, F. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1938, **71**, p. 718

[34] Boulanger, P. and Montreuil, J. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1951, **33**, pp. 784, 791

[35] Marrian, D. H., Spicer, V. L., Balis, M. E. and Brown, G. B. *J. biol. Chem.* 1951, **189**, p. 533

[36] Davidson, J. N. and Smellie, R. M. S. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 594

[37] Mandel, P., Weill, J. D. and Ledig, M. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1956, **38**, p. 71

[38] Levene, P. A. and Mandel, J. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1908, **41**, p. 1905

[39] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *J. biol. Chem.* 1912, **12**, p. 411

[40] Levene, P. A. *J. biol. Chem.* 1921, **48**, p. 119
[41] Thannhauser, S. J. and Ottenstein, B. *Hoppe-Seyl. Z.* 1921, **114**, p. 39
[42] Thannhauser, S. J. and Blanco, G. *Hoppe-Seyl. Z.* 1926, **161**, p. 116
[43] Levene, P. A. *J. biol. Chem.* 1938, **126**, p. 63
[44] Dekker, C. A., Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1953, p. 947
[45] Loring, H. S. and Carpenter, F. H. *J. biol. Chem.* 1943, **150**, p. 381
[46] Schmidt, G., Cubiles, R., Zöllner, N., Hecht, L., Strickler, N., Seraidarian, K., Seraidarian, M. and Thannhauser, S. J. *J. biol. Chem.* 1951, **192**, p. 715
[47] Loring, H. S., Carpenter, F. H. and Roll, P. M. *J. biol. Chem.* 1947, **169**, p. 601
[48] Schmidt, G. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 555
[49] Gulland, J. M. and Jackson, E. M. *J. chem. Soc.* 1938, p. 1492
[50] Cohn, W. E. and Volkin, E. *Nature, Lond.* 1951, **167**, p. 483
[51] Cohn, W. E. and Volkin, E. *J. biol. Chem.* 1953, **203**, p. 319
[52] Volkin, E., Khym, J. X. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1533
[53] Carter, C. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1537
[53a] Cunningham, L., Catlin, B. W. and de Garilhe, M. P. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 4642
Cunningham, L. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 2546
[53b] Koerner, J. F. and Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1957, **228**, pp. 1039, 1049
[53c] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1910, **43**, p. 3150
[53d] Bredereck, H., Martini, A. and Richter, F. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1941, **74**, p. 694
[53e] Gulland, J. M. and Hobday, G. I. *J. chem. Soc.* 1940, p. 746
[53f] Gulland, J. M. and Smith, H. *J. chem. Soc.* 1947, p. 338
[53g] Harris, R. J. C. and Thomas, J. F. *J. chem. Soc.* 1948, p. 1936
[53h] Bacher, J. E. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1951, **188**, p. 59
[53i] Gulland, J. M. and Macrae, T. F. *J. chem. Soc.* 1933, p. 662
[53j] Loring, H. S., Hammell, M. L., Levy, L. W. and Bortner, H. W. *J. biol. Chem.* 1952, **196**, p. 821
[53k] Reichard, P., Takenaka, Y. and Loring, H. S. *J. biol. Chem.* 1952, **198**, p. 599
[54] Cohn, W. E. *J. cell. comp. Physiol.* 1951, **38**, Supplement 1, p. 21

[55] Cohn, W. E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 211

[56] See for example:
Tompkins, E. R. *J. chem. Educ.* 1949, **26**, pp. 32, 92
Samuelson, O. *Ion-exchangers in Analytical Chemistry*: John Wiley, New York, 1953
Colman, C. and Kressman, T. R. E. (Eds.) *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry*: Interscience, New York, 1957

[57] Cohn, W. E. *Science* 1949, **109**, p. 377

[58] Cohn, W. E.—unpublished result quoted in reference 55

[59] Reichard, P. and Estborn, B. *Acta chem. scand.* 1950, **4**, p. 1047

[60] Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 1471

[61] Andersen, W., Dekker, C. A. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 2721

[62] Cohn, W. E. and Khym, J. X. *Biochem. Prep.* 1957, **5**, p. 40

[63] Kerr, S. E., Seraidarian, K. and Brown, G. B. *J. biol. Chem.* 1951, **188**, p. 207

[64] Khym, J. X. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 1153

[65] Sinsheimer, R. L. and Koerner, J. F. *Science* 1951, **114**, p. 42

[66] Hurst, R. O., Little, J. A. and Butler, G. C. *J. biol. Chem.* 1951, **188**, p. 705

[67] Hurst, R. O., Marko, A. M. and Butler, G. C. *J. biol. Chem.* 1953, **204**, p. 847

[68] Cohn, W. E., Volkin, E. and Khym, J. X. *Biochem. Prep.* 1957, **5**, p. 49

[69] Zamenhof, S. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1950, **187**, p. 1

[70] Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 2811

[71] Loring, H. S., Luthy, N. G., Bortner, H. W. and Levy, L. W. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 2811

[72] Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1949, **71**, p. 2275

[73] Jaenicke, L. and von Dahl, K. *Naturwissenschaften* 1952, **39**, p. 87

[74] Khym, J. X., Doherty, D. G., Volkin, E. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 1622

[75] Khym, J. X. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, p. 1818

[76] Khym, J. X. and Cohn, W. E. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **15**, p. 139

[77] Vischer, E. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1947, **168**, p. 781

[78] Holiday, E. R. and Johnson, E. A. *Nature, Lond.* 1949, **161**, p. 216

[79] Chargaff, E., Magasanik, B., Doniger, R. and Vischer, E. *J. Amer. chem. Soc.* 1949, **71**, p. 1513

[80] Carter, C. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 1466
[81] Markham, R. and Smith, J. D. *Nature, Lond.* 1949, **163**, p. 250
[82] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1949, **45**, p. 294
[83] Edström, J. E. *Nature, Lond.* 1951, **168**, p. 876
[84] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1950, **46**, p. 513
[85] Kream, J. and Chargaff, E. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 4274
[86] Matthews, R. E. F. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 1065
[87] Lasnitzki, I., Matthews, R. E. F. and Smith, J. D. *Nature, Lond.* 1954, **173**, p. 346
[88] Hanes, C. S. and Isherwood, F. A. *Nature, Lond.* 1949, **164**, p. 1107
[89] Boulanger, P. and Montreuil, J. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1951, **33**, p. 784
[90] Magasanik, B., Vischer, E., Doniger, R., Elson, D. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1950, **186**, p. 37
[91] Wade, H. E. and Morgan, D. M. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 529
[92] Buchanan, J. G., Dekker, C. A. and Long, A. G. *J. chem. Soc.* 1950, p. 3162
[93] Wyatt, G. R. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 243
[94] Markham, R. *Brit. med. Bull.* 1954, **10**, p. 214
[95] Vischer, E. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1948, **176**, p. 703
[96] Knight, C. A. *J. biol. Chem.* 1953, **197**, p. 241
[97] Hamoir, C. *Biochem. J.* 1952, **50**, p. 140
[98] Whitfield, P. R. *Aust. J. sci. Res. B.* 1953, **6**, p. 234
[99] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 552
[100] Smith, J. D. and Stoker, M. *Brit. J. exp. Path.* 1951, **32**, p. 433
[101] Smith, J. D. and Wyatt, G. R. *Biochem. J.* 1951, **49**, p. 144
[102] Wyatt, G. R. *J. gen. Physiol.* 1952, **36**, p. 201
[103] Elmes, P. C., Smith, J. D. and White, J. C. *Deuxième Congrés International de Biochemie, Paris* 1952; *resumés des communications*, p. 8
[104] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 558
[105] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 565
[106] Brown, D. M., Dekker, C. A. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 2715
[107] Smith, J. D. and Markham, R. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **8**, p. 350
[108] Smith, J. D. and Markham, R. *Nature, Lond.* 1952, **170**, p. 120
[109] Wyatt, G. R. and Cohen, S. S. *Nature, Lond.* 1952, **170**, pp. 846, 1072
[110] Schramm, G. and von Kerekjarto, B. *Z. Naturf.* 1952, **7b**, p. 589
Sherrat, H. S. A. and Thomas, A. J. *J. gen. Microbiol.* 1953, **8**, p. 217

[111] Brown, D. M., Magrath, D. I. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 2708
[112] Brown, D. M., Heppel, L. A. and Hilmoe, R. J. *J. chem. Soc.* 1954, p. 40
[113] Snellman, O. and Gelotte, B. *Nature, Lond.* 1951, **168**, p. 461
[114] Gordon, A. H. and Reichard, P. *Biochem. J.* 1951, **48**, p. 569
[115] Markham, R. and Smith, J. D. *Nature, Lond.* 1951, **168**, p. 406
[116] Crestfield, A. M. and Allen, F. W. *Analyt. Chem.* 1955, **27**, p. 422
[117] Davidson, J. N. and Smellie, R. M. S. *Biochem. J.* 1952, **52**, pp. 594, 599
[118] Werkheiser, W. and Winzler, R. *J. biol. Chem.* 1953, **204**, p. 971
[119] Wieland, T. and Bauer, L. *Angew. Chem.* 1951, **63**, p. 512
[120] Crestfield, A. M. and Allen, F. W. *Analyt. Chem.* 1955, **27**, p. 424
[121] Crosbie, G. W., Smellie, R. M. S. and Davidson, J. N. *Biochem. J.* 1953, **54**, p. 287
[122] Boeseken, J. *Advanc. Carbohyd. Chem.* 1949, **4**, p. 189
[123] See also Jaenicke, L. and Vollbrechtshausen, I. *Naturwissenschaften* 1952, **39**, p. 86
[124] Consden, R., Gordon, A. H. and Martin, A. J. P. *Biochem. J.* 1946, **40**, p. 33
[125] Smith, J. D. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 267
[126] Dimroth, K., Jaenicke, L. and Vollbrechtshausen, I. *Hoppe-Seyl. Z.* 1952, **289**, p. 71
[127] Burke, D. C. *Chem. & Ind. (Rev.)* 1954, p. 1510
[128] Loring, H. S. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson). Academic Press, New York, 1955, p. 191
[129] Chargaff, E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 307
[130] Magasanik, B. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 373
[131] Chargaff, E., Vischer, E., Doniger, R., Green, C. and Misani, F. *J. biol. Chem.* 1949, **177**, p. 405
[132] Chargaff, E. and Lipshitz, R. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 3658
[133] Zamenhof, S., Shettles, L. B. and Chargaff, E. *Nature, Lond.* 1950, **165**, p. 756
[134] Chargaff, E., Lipshitz, R., Green, C. and Hodes, M. E. *J. biol. Chem.* 1951, **192**, p. 223
[135] Chargaff, E., Lipshitz, R. and Green, C. *J. biol. Chem.* 1952, **195**, p. 155

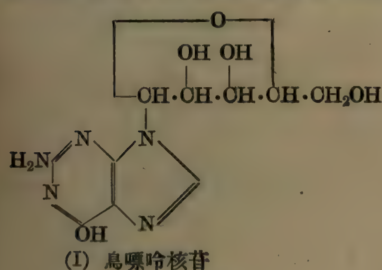
[136] Brawerman, G. and Chargaff, E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 4052
[137] Crestfield, A. M., Smith, K. C. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1955, **216**, p. 185
[138] Elson, D. and Chargaff, E. *Nature, Lond.* 1954, **173**, p. 1037
[139] Kirby, K. S. *Biochem. J.* 1956, **64**, p. 405
[140] Volkin, E. and Carter, C. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1516
[141] Dorner, R. W. and Knight, C. A. *J. biol. Chem.* 1953, **205**, p. 959
[142] Elson, D. and Chargaff, E. *Fed. Proc.* 1951, **10**, p. 180
[143] Elson, D., Gustafson, T. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1954, **209**, p. 285
[144] Elson, D., Trent, L. W. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **17**, p. 367
[145] Elson, D. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **17**, p. 367
[146] Johnson, T. B. and Coghill, R. D. *J. Amer. chem. Soc.* 1925, **47**, p. 2838
[147] Davis, F. F. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1957, **227**, p. 907
[148] Adler, M., Weissmann, B. and Gutman, A. B. *J. biol. Chem.* 1958, **230**, p. 717

第五章　核苷的結构及其合成

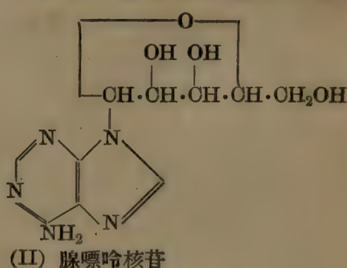
引　言

核酸中的重复单位是核苷酸，它們在許多方面相当于蛋白质中的氨基酸。核苷酸除了以聚合的形式存在于核酸中外尙能以单分子状态如具有生物活力的輔酶一样存在于細胞中。核苷酸是核苷的磷酸酯，核苷則是嘌呤或嘧啶的苷。这些核苷一般不以游离的状态存在于細胞中。如已在第四章中所叙述的，核苷和核苷酸可用化学方法水解核酸或用酶水解核酸来制备，或在許多情况下，可用合成方法制备。

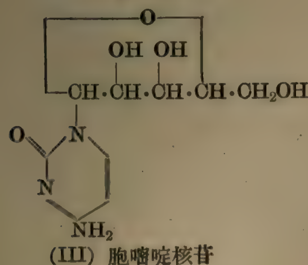
几乎所有核苷的結构特点目前都已經确定。核糖核酸中存在的核苷为鳥嘌呤核苷(I)、腺嘌呤核苷(II)、胞嘧啶核苷(III)和尿嘧啶核苷(IV)。鳥嘌呤核苷和腺嘌呤核苷为最早从核酸中分离出



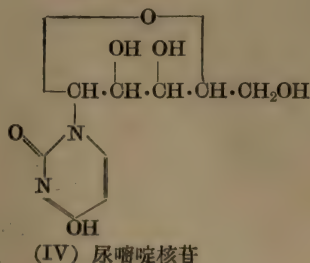
(I) 鳥嘌呤核苷



(II) 腺嘌呤核苷



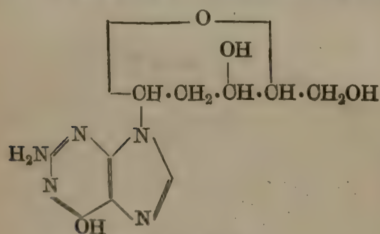
(III) 胞嘧啶核苷



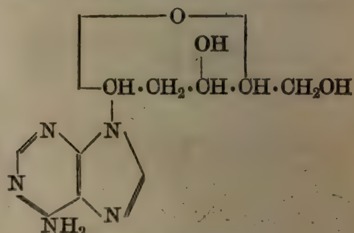
(IV) 尿嘧啶核苷

来的两个核苷。它們分别为鳥嘌呤的和腺嘌呤的 9-β-D-呋喃核糖苷。胞嘧啶核苷和尿嘧啶核苷为胞嘧啶的和尿嘧啶的 3-β-D-呋喃核糖苷。

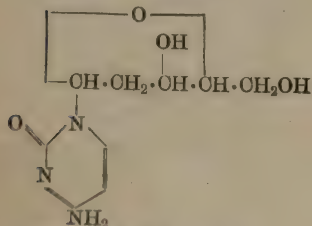
存在于脱氧核糖核酸中的嘌呤核苷为脱氧鳥嘌呤核苷（鳥嘌呤脱氧核糖核苷）(V) 和脱氧腺嘌呤核苷（腺嘌呤脱氧核糖核苷）(VI)。只有脱氧腺嘌呤核苷的苷鍵构型曾經测定过，并发現它是一个 β-苷。虽然沒有对脱氧鳥嘌呤核苷作过类似的研究，这似乎实际上已經肯定：因为脱氧腺嘌呤核苷和脱氧胞嘧啶核苷以及脱氧胸腺嘧啶核苷**（参看下面）都是 β-苷，因此所有的天然脱氧核糖核苷都应該具有这种构型[1]。脱氧鳥嘌呤核苷和脱氧腺嘌呤核苷因而分别为鳥嘌呤的和腺嘌呤的 9-β-D-(2′-脱氧) 呋喃核糖苷。脱氧核糖核酸中的嘧啶核苷主要为脱氧胞嘧啶核苷*（胞嘧啶脱氧核糖核苷）(VII) 和脱氧胸腺嘧啶核苷**（胸腺嘧啶脱氧核糖核苷）(VIII)。它們分别为胞嘧啶的和胸腺嘧啶的 3-β-D-(2′-脱氧) 呋喃核糖苷。有些脱氧戊糖核酸则含有少量的 5-甲基胞嘧啶



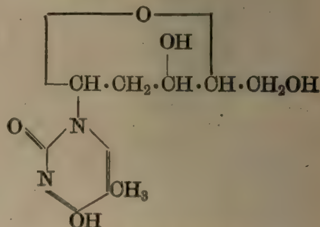
(V) 脱氧鳥嘌呤核苷



(VI) 脱氧腺嘌呤核苷



(VII) 脱氧胞嘧啶核苷*

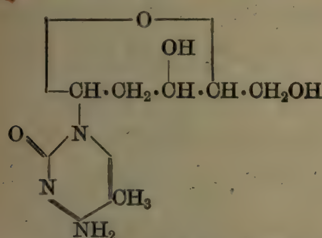


(VIII) 脱氧胸腺嘧啶核苷**

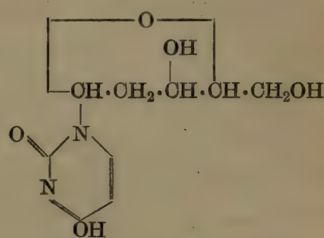
* 原文誤，应为 Deoxycytidine（譯者注）

** 原文誤，应为 Deoxythymidne（譯者注）

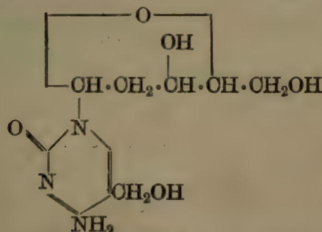
脱氧核糖核苷 (IX) 和尿嘧啶脱氧核糖核苷(X)(这可能是由于脱氧胞嘧啶核苷經微生物的脱氨作用后所产生的一个矯作物[2]),而噬菌体的脱氧戊糖核酸則含有 5-羥甲基胞嘧啶脱氧核糖核苷(XI),它在脱氧戊糖核酸中完全代替了脱氧胞嘧啶核苷。虽然对这些核苷的結构尙未做过研究,但这三种核苷极可能都是相应碱基的 3-β-D-(2′-脱氧)呋喃核糖苷。



(IX) 5-甲基胞嘧啶脱氧核糖核苷



(X) 尿嘧啶脱氧核糖核苷



(XI) 5-羥甲基胞嘧啶脱氧核糖核苷

嘌呤碱和嘧啶碱的本性与結构

嘌呤碱和嘧啶碱首先是从核苷的水解产物中分出,并且用有机化学的經典方法加以鉴定。如我們在第四章中所見到的,这些分离操作現在已能很容易地借层析方法来进行。根据历史,鳥嘌呤核苷是第一个分离出来的核苷,它是在 1885 年由 Schulze 和 Bosshard[3] 所发現的。Levene 和 Jacobs[4] 指出,当用稀酸水解鳥嘌呤核苷时,則得到鳥嘌呤(2-氨基-6-氧嘌呤)。Levene 和 Jacobs[5] 首先从核酸中分离出腺嘌呤核苷,并指出这个核苷經酸水解后即产生腺嘌呤(6-氨基嘌呤)。先前 Kossel[6,7] 曾从牛胰核

酸的酸水解产物中分离出腺嘌呤，而 Fischer[8] 用 2, 6, 8-三氯嘌呤进行部分合成确定了它的結构。当用强酸水解时，曾发現尿嘧啶核苷和胞嘧啶核苷分别产生尿嘧啶（2, 4-二氧嘧啶）和胞嘧啶（4-氨基-2-氧嘧啶）[9]。Levene 和 London[10] 以及 Klein[11] 首先从水解相应的脱氧核糖核苷得到腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。

直到 1925 年，腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶为所知道的核酸中的仅有的碱基。也就在那一年，Johnson 和 Coghill[12] 发表了核酸中倘含有 5-甲基胞嘧啶。他們从結核杆菌中所得的一种核酸的水解产物中以苦味酸盐的形式分离出 5-甲基胞嘧啶。現在已能用层析方法[13~16]証实 5-甲基胞嘧啶作为少量的嘧啶成分（約占总碱基組成成分的 1～3%，参看第四章，表 6）存在于几种来源的脱氧戊糖核酸中。5-甲基胞嘧啶以較高的比例存在于麦芽的脱氧戊糖核酸中（为总碱基的 6%）[16]。随着观察到大腸杆菌 T2 噬菌体中[17]不存在有胞嘧啶，Wyatt 和 Cohen [18,19] 发現在偶数編号的 T 噬菌体的脱氧戊糖核酸中 5-羥甲基胞嘧啶完全取代了胞嘧啶。

嘧啶碱和嘌呤碱的詳細結构不仅在决定核苷和核苷酸的結构上具有重要的意义，在决定核酸的結构上也具有同等的重要性。举一个例来說：—NH—CO— 基团到底是以酮型存在抑以烯醇型存在对碱基对間特殊氫鍵的形成具有重要的意义。氫鍵的形成是脱氧戊糖核酸的 Watson-Crick 模型的一个重要特征。这个結构視苷鍵的构型而定，而这些苷鍵的构型在所有核苷酸中都是等同的。

虽然关于胸腺嘧啶的单个分子大小的初步研究結果曾有所記載[20]，但是已經知道的存在于核酸中的五种嘧啶的結构的細节还沒有用 X-射綫測定出来。Clews 和 Cochran[21,22] 測定了某些有关嘧啶的衍生物，如 2-氨基-4-甲基-6-氯嘧啶、2-氨基-4, 6-二氯嘧啶、4-氨基-2, 6-二氯嘧啶和 5-溴-4, 6-二氨基嘧啶等的結构，其詳細情况見图 22。嘧啶环被认为是在一个平面上[21~23]，而 C—N 和 C—C 鍵的鍵长約相当于具有双鍵特性的鍵的 50%，这可从一个有可能存在着苯型結构的共振的六員环預期到。究竟这样

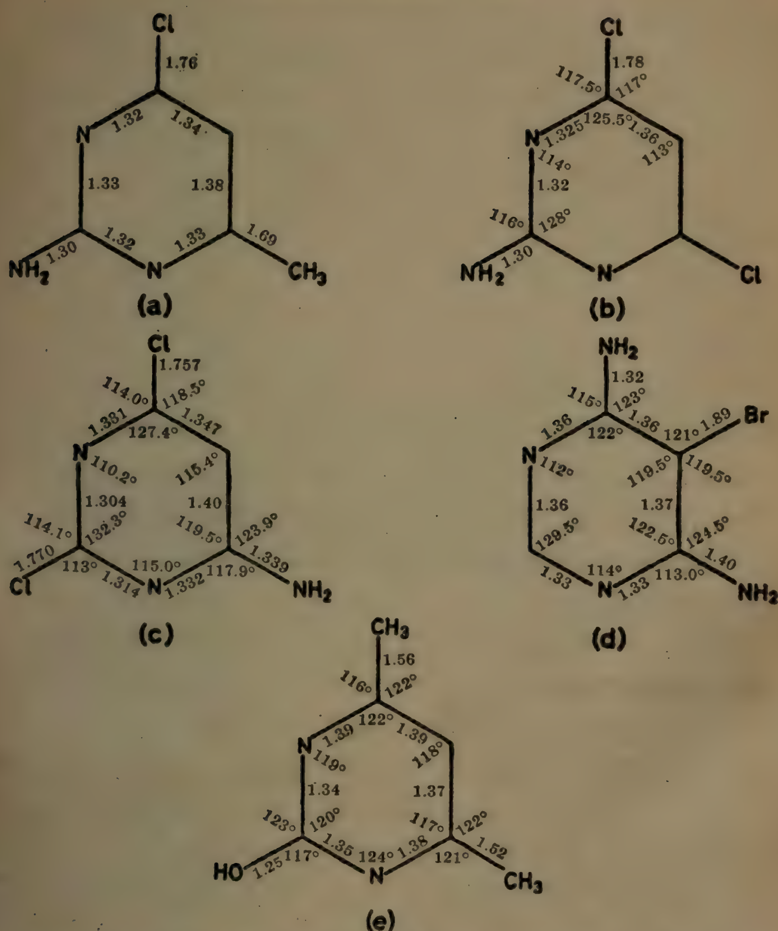
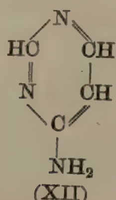


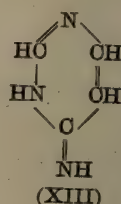
图 22 (a)2-氨基-4-甲基-6-氯嘧啶；(b)2-氨基-4,6-二氯嘧啶；(c)4-氨基-2,6-二氯嘧啶；(d)5-溴-4,6-二氨基嘧啶；(e)2-羥基-4,6-二甲基嘧啶的結构〔(a～d) C. J. B. Clews 和 W. Cochran: *Acta Cryst*. 1948, **1**, 10 頁；*Acta Cryst*. 1949, **2**, 55 頁。(e) 摘自 G. J. Pitt: *Acta Cryst*. 1948, **1**, 172 頁〕

的共振是否能在核酸中的氨基嘧啶和羥基嘧啶中发生将取决于这个氨基是否以氨基抑或以亚氨基存在和这个羥基是否以烯醇型抑或以酮型存在。假使互变发生后使 6-氨基嘧啶(XII)轉变成相应的亚氨基二氫嘧啶(XIII)，則嘧啶核中的 6 位或 4 位上的氨基将

显示出还原性的减少。X-射綫的証据[22]表明在結晶状态时，4-氨基-2,6-二氯嘧啶和5-溴-4,6-二氨基嘧啶都以氨基状态存在，因此很可能胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶和5-羥甲基胞嘧啶亦以氨基的状态存在。关于 —NH—CO— 基团中氫原子所在的位置，亦卽这



(XII)



(XIII)

些基团是以酮型抑以烯醇型存在的問題，可以从 Pitt[24] 在 2-羥基-4,6-二甲基嘧啶中所測定的 C—O 鍵长加以决定。这个化合物的結构細节亦見于图 22(*e*)。C—O 的鍵长是 1.25±0.04Å，它和間-苯二酚中相应的酚羥基的鍵长(1.36～1.37Å)显然不同，但更接近于二水合草酸中的 C—O 鍵的鍵长(1.24～1.30Å)。因此，在晶体中，C—O 鍵具有很多的双鍵的性质，虽然氫原子仍与氧原子以共价鍵相結合，并参与氧原子与一个水分子間的氫鍵的形成。但是，在水溶液中，氫原子的位置并不一定和在晶体中的相同，而各种嘧啶溶液的紫外吸收光譜証据指出酮型在溶液中佔优势。早先的工作曾把 —NH—CO— 基的烯醇化作用与电离作用混淆起来[25～27]，但是，Marshall 和 Walker[28] 从測定許多 2-和 4(6)-被取代的嘧啶的紫外吸收光譜以及相应的在水溶液中的 $N_{(1)}$-和 $N_{(3)}$-甲基化的衍生物的紫外吸收光譜，其水溶液具有这样的 pH 值，使这些物质全部以中性分子存在或全部以离子存在，断定所有可能的 2-和 4(6)-羥基嘧啶在結构上必須以酮型的形式存在，就是以嘧啶酮存在。因此尿嘧啶必須当作是 2,4(6)-嘧啶二酮。

Bernal 和 Crowfoot[29] 首先研究了腺嘌呤盐酸盐的結构，但单个分子中原子的位置尚未有人加以測定。可是 Broomhead[30,31] 以及 Cochran[32] 曾对腺嘌呤盐酸盐和鳥嘌呤盐酸盐两者的結构作了更詳尽的研究。它們的鍵长和鍵角見图 23。这两个分子的結构

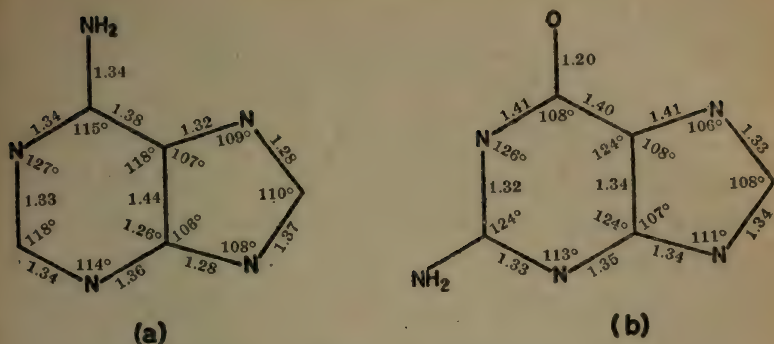


图 23 (a) 腺嘌呤；(b) 鳥嘌呤的結构

(J. M.Broomhead: *Acta Cryst*. 1948, **1**, 327 頁; *Acta Cryst*. 1951, **4**, 97 頁)

是十分类似的，其主要差别在于鳥嘌呤的氨基氮原子〔$N_{(10)}$〕偏离分子中的含有其他原子的平面約 0.11Å 以及腺嘌呤中的 $C_{(4)}$—$C_{(5)}$ 的鍵长較鳥嘌呤中的长 0.10Å。这个可能由于实驗誤差[31]所引起的差别是与腺嘌呤和鳥嘌呤的不同酸碱性质相一致的（参看第七章，135 頁）。$C_{(6)}$—O 的鍵长（1.20Å）指出它主要带有双鍵的性质，因此証实了鳥嘌呤一般所习用的酮型分子式。但是，鍵长的誤差卽使只有 −0.05Å（卽得到的鍵长为 1.25Å），亦将使这个鍵可与甘氨酸和二酮吡嗪中的 C—O 鍵的鍵长相比拟，这两个化合物中的 C—O 鍵只具有 50% 的双鍵性质。

Broomhead[31] 和 Cochran[32] 曾考虑过結晶状态的腺嘌呤和鳥嘌呤阳离子中的氫原子位置。在腺嘌呤阳离子中，氫原子是在 $N_{(1)}$、$C_{(2)}$、$C_{(8)}$、$N_{(9)}$上，还有两个在 $N_{(10)}$ 上。正电荷可在 $N_{(1)}$、$N_{(9)}$ 或 $N_{(10)}$ 上。較短的 $C_{(6)}$—$N_{(10)}$ 鍵长（1.34Å，和一个单鍵的鍵长 1.47Å 相比的）可能是由于共振型所造成的，在这种型式中，$N_{(10)}$ 带有一个正电荷，而 $C_{(6)}$—$N_{(10)}$ 鍵是一个双鍵。在鳥嘌呤阳离子中的氫原子的位置了解得不太确切。四个氫原子是在 $N_{(1)}$、$N_{(9)}$、$N_{(10)}$ 和 $C_{(8)}$ 位置上，而在晶体中 $N_{(3)}$ 和 $N_{(10)}$ 間以及 O 和 $N_{(7)}$ 間都有氫鍵存在。因此有四种可能的互变异构形式。在水溶液中，这种互变异构体間的区别是沒有什么意义的。

碳水化合物組分的本性与結构

Hammarsten[33] 根据单純的定性試驗和糖脎的性质认为戊糖核酸中的碳水化合物是一种戊糖。Levene 和 Jacobs[34] 成功地分离出这种糖的結晶，并报道它是一个类似阿拉伯糖的新糖，但在几个重要方面却与之有别。他們断定这个新糖是 D-核糖，它的完全証实是由于 van Ekenstein 和 Blanksma[35] 主要应用了与 Fischer 和Piloty[36] 的相同方法合成了 L-核糖，而 Fischer 和 Piloty 早先曾制备过无定形的核糖。从酵母核糖核酸中所得的四种核苷酸中的糖的本性現在已由 Gulland 和 Barker 及其同工者[37~40] 在使个别核苷酸的糖組分变成 D-核糖苯并咪唑而加以証实。

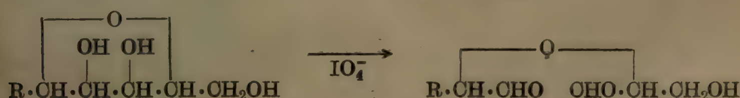
脫氧戊糖核酸中糖組分的鉴别确乎有困难。这是因为糖在酸溶液中缺乏明显的稳定性和它的合成不易的緣故。应用从核糖核苷酸中分离糖的类似条件将糖用酸水解会使糖轉变成乙酰丙酸。但是，若利用稀酸在短时間內水解，則可得到結晶状态的脫氧戊糖[10,41]。檢定所制得的糖的衍生物并与合成的 L-2-脫氧核糖相比較可以断定所分离出来的糖是 D-2-脫氧核糖[42]。

最近，Laland 和 Overend[43] 以及 Jones 和 Laland[44]曾从鰵魚卵和鯡魚卵以及 *Mycobacterium phlei* 中的脫氧核糖核酸中分离出 D-2-脫氧核糖。这个核糖，曾用与标准的 D-2-脫氧核糖作混合熔点和旋光度的测定以及制成已知的苯胺-D-脫氧核糖苷加以証实[45,46]。Walker 和 Butler[47] 用树脂水解，酶促水解以及用汞齐还原后继以酸水解的方法曾从小牛胸腺脫氧核糖核酸的核苷中分离出糖組分，并通过生成苄基苯腙加以証实。他們也断定这个糖是 D-2-脫氧核糖。

許多方法曾用来测定核糖核苷中和脫氧核糖核苷中糖殘基的呋喃糖結构。腺嘌呤核苷或鳥嘌呤核苷經乙酰化后继以甲基化和去乙酰化产生三甲基-N-甲基的衍生物，这个衍生物用稀酸水解时則生成相应的 N-甲基嘌呤和三甲基核糖[48]。甲基化的核糖的

結构是由氧化成2,3,5-三甲基-γ-D-核糖內酯,然后变为內消旋-二甲氧基丁二酸,同时与合成的2,3,5-三甲基-D-呋喃核糖[49]相比較而加以确定的。嘧啶核苷中糖殘基的呋喃糖結构也以类似的方法加以判定[50]。呋喃糖的結构曾被Bredereck[51~54]以及Levene和Tipson[55,56]在研究核糖核苷与三苯氯甲烷的反应时加以証实。并且,在酸性脱水剂的存在下,腺嘌呤核苷、鳥嘌呤核苷、次黃嘌呤核苷以及尿嘧啶核苷与丙酮的反应都产生相应的2′,3′-亚异丙基衍生物[56,57]。次黃嘌呤核苷和尿嘧啶核苷的衍生物都生成5′-甲苯磺酰衍生物(5′-tosyl derivatives),这个衍生物与碘化鈉作用时則生成5′-碘化物。这些反应都与呋喃糖結构的反应相一致。

呋喃糖結构的进一步証实是从过碘酸盐对核糖核苷*和脱氧核糖核苷的作用而来。核糖核苷的氧化涉及每分子核苷要消耗1分子过碘酸盐,并且使核糖核苷轉变成相应的二醛,而同时沒有甲酸释出。这个反应和糖的呋喃糖結构的反应相一致[58]。若是脱氧核糖核苷,則不发生氧化作用,这表明在这些化合物中沒有顺-1,2-二醇体系存在,这种見解又符合呋喃糖的結构[59]。

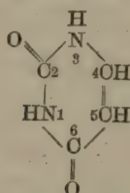


苷鍵的位置

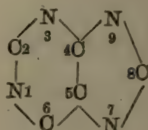
因为亚硝酸能使胞嘧啶核苷脱氨变成尿嘧啶核苷[60],因此在这两种核苷中苷鍵的位置是相同的。这还表明,在这些核苷中,这个鍵的生成并不涉及6位上的取代基。在尿嘧啶(XIV)結构中,余下的可被苷鍵所佔有的四个位置中,位置1可予摈除,因为尿嘧啶核苷可以轉变成N-甲基尿嘧啶核苷,而这个核苷被水解时則生成1-甲基尿嘧啶[61]。位置5也可排除,因为尿嘧啶核苷能轉变为

* 原文誤,应为Ribonucleosides(譯者注)

5-硝基尿嘧啶核苷和5-溴尿嘧啶核苷，它們經水解后都生成相应的尿嘧啶衍生物[62]。位置4和5也可以排除掉，因为尿嘧啶核苷經溴作用后再与苯肼反应会生成4,5-二苯肼尿嘧啶核苷，表明在这两个位置上都沒有取代基存在[63]。剩下的只有位置3，因此尿嘧啶核苷和胞嘧啶核苷看来都是3-苷。



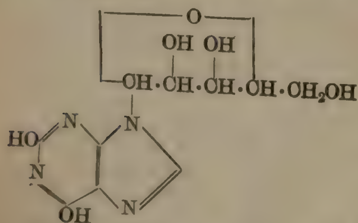
(XIV) 尿嘧啶



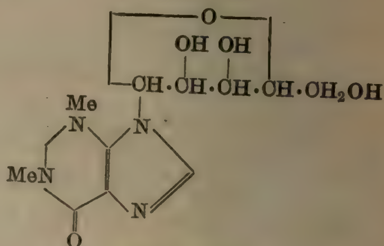
(XV) 嘌呤核

Furberg[64] 亦用 X-射綫方法測定了胞嘧啶核苷的結构(参看110頁)，并証实苷鍵的位置是在 $N_{(3)}$。Bredereck、Müller 和 Berger[65] 对胸腺嘧啶核苷中苷鍵的位置采用了同样的論据，认为胸腺嘧啶核苷也是一个 $N_{(3)}$ 苷。Huber 的 X-射綫研究也証实了这个結构[66]。

至于嘌呤核苷，因为在酸溶液中容易水解，因此认为嘌呤与糖之間的鍵是一个 C—N 鍵而不是 C—C 鍵。因为亚硝酸能够很快地使嘌呤核苷脫氨[60,67~69]而不影响及苷鍵，这就証明腺嘌呤和鳥嘌呤的氨基并不参加苷鍵的形成。



(XVI) 黃嘌呤核苷



(XVII) 茶碱核糖核苷

因此成苷的可能位置是1,3,7和9(XV)。位置1和3可以排除，因为从鳥嘌呤核苷脫氨所得到的黃嘌呤核苷(XVI)經甲基化后会变成茶碱核糖核苷(XVII)[69]。在余下的7和9两个位置中，

最初是假定苷鍵在 $N_{(7)}$ 上。但是后来 Gulland 及其同工者[67,70,71]把它更改在 $N_{(9)}$ 上，其原因是腺嘌呤核苷和次黄嘌呤核苷以及烏嘌呤核苷和黄嘌呤核苷的吸收光譜与 9-甲基嘌呤碱的吸收光譜的相似程度較 7-甲基嘌呤碱的为大。因为脫氧腺嘌呤核苷[72]和脫氧烏嘌呤核苷的吸收光譜与腺嘌呤核苷和烏嘌呤核苷的吸收光譜相似，因此亦断定这些核苷必然也是 $N_{(9)}$-苷。虽然还沒有用 X-射綫方法来测定嘌呤核苷的詳細結构，但 Furberg[73] 的初步研究已証实了苷鍵的位置是在 $N_{(9)}$ 上。

Todd 及其同工者对苷鍵构型以及对核苷合成的广泛研究証实了嘌呤核苷和嘧啶核苷以及脫氧嘌呤核苷和脫氧嘧啶核苷中的苷鍵的位置（参看下面）。

苷鍵的构型

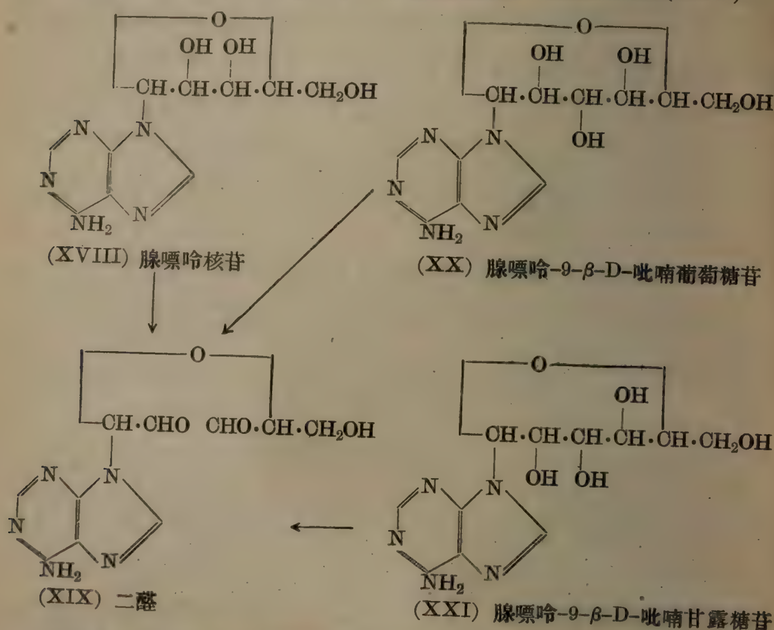
核苷被过碘酸盐氧化后生成相应的二醛和甲酸，配合着具有肯定結构的新的核苷酸的合成，使测定苷鍵的构型成为可能，同时也証实了糖殘基的位置。

Davoll、Lythgoe 和 Todd[74] 发現将腺嘌呤核苷（XVIII）和腺嘌呤 9-β-D-吡喃葡萄糖苷（XX）用过碘酸盐氧化所得的二醛〔α-(腺嘌呤-9)-α'-羥甲基二甘醇二醛，α-(adenine-9)-α'-hydroxymethyldiglycollic dialdehyde〕(XIX) 是相同的。虽然在用 α-溴乙酰葡萄糖合成时曾經假定有 Walden 反轉产生，致糖苷的 β-构型不能絕对肯定，但是仍可认为有理由假定糖苷具有 β-构型，因此腺嘌呤核苷亦为 β-构型。

同样，胞嘧啶核苷和胞嘧啶-3-β-D-吡喃葡萄糖苷被过碘酸盐氧化所成的二醛的一致性以及尿嘧啶核苷和尿嘧啶-3-β-D-吡喃葡萄糖苷[74]被过碘酸盐氧化所成的二醛的一致性也指出了天然核苷是属于 β-构型，并証实了苷鍵的位置。

由上面所述的用于糖苷的合成的方法所引起的关于核苷的 β-构型的一些疑点，已为一个完全明确的腺嘌呤-9-β-D-吡喃甘

露糖苷(XXI)的合成方法所消除，这个糖苷被过碘酸盐氧化时产生一个和从腺嘌呤核苷(XVIII)所得到的一样的二醛(XIX)[75]。



(XVIII) 腺嘌呤核苷

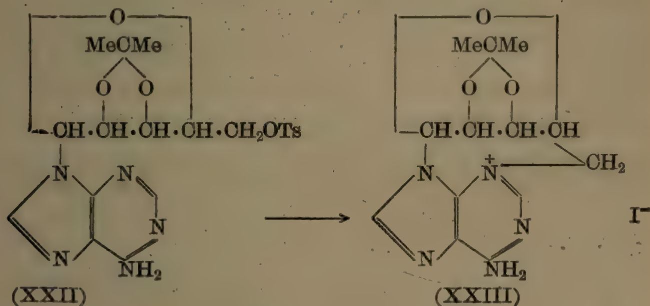
(XX) 腺嘌呤-9-β-D-吡喃葡萄糖苷

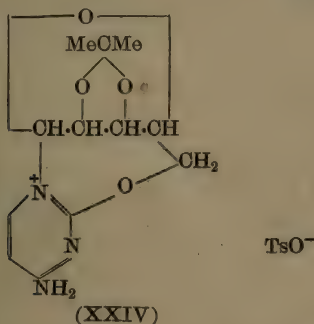
(XIX) 二醛

(XXI) 腺嘌呤-9-β-D-吡喃甘露糖苷

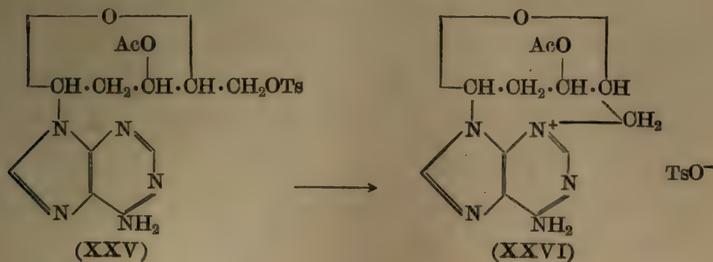
Clark、Todd 和 Zussman[76] 提供了天然核糖核苷的 β-构型的进一步証据。他們将 2′,3′-亚异丙基腺嘌呤核苷加以甲苯-对-磺酰化制成了甲苯-对-磺酰酯，2′,3′-亚异丙基-5′-甲苯-对-磺酰腺嘌呤核苷(XXII)。这种酯在丙酮溶液中加热时迅速轉变为一个离子化的异构体，这个异构体用碘化鈉处理时则产生一个离子化的碘化物。从这个离子化的化合物的化学研究和 X-射綫結晶照相分析証明它是 2′,3′-亚异丙基-$N_{(3)}$,$C'_{(5)}$-环状腺嘌呤核苷的盐(XXIII)，在它的分子中由于分子內部的烴基化作用形成了一个新的环。从空間阻碍的观点出发，这种环状核苷只有在原来核苷具有 β-构型时才有可能形成。次黄嘌呤核苷和尿嘧啶核苷的甲苯-对-磺酰衍生物就不能生成类似的环状衍生物，但是 2′,3′-亚异丙基-5′-甲苯-对-磺酰胞嘧啶核苷可以同样地重排成一个环状的衍生物，2′,3′-亚异丙基-$O_{(2)}$,5′-环状胞嘧啶核苷(XXIV)。

上述的合成方法具有特別重要的意义，因为它可以应用于脱氧核糖核苷的合成，而脱氧核糖核苷的合成显然是不能应用过碘酸盐的方法。Andersen、Hayes、Michelson 和 Todd[1] 曾采用这个方法来証实脱氧腺嘌呤核苷和脱氧胞嘧啶核苷的 β-构型。将 3′-乙酰-2′-脱氧腺嘌呤核苷进行甲苯-对-磺酰化可得到 3′-乙





酰-2′-脱氧-5′-甲苯-对-磺酰腺嘌呤核苷 (XXV)，这个核苷在热的丙酮中立即轉变为环状核苷(XXVI)的盐。



Michelson 和 Todd[77] 从胸腺嘧啶核苷經过相应的甲烷磺酰-或甲苯-对-磺酰胸腺嘧啶核苷曾制备了 $O_{(2)}$, 3′-环状胸腺嘧啶核苷和 $O_{(2)}$, 5′-环状胸腺嘧啶核苷的环状衍生物。环状胸腺嘧啶核苷的化学性质与胸腺嘧啶核苷的 β-构型的性质相符合。5′-溴-5′-脫氧胸腺嘧啶核苷的 X-射綫結晶照相研究也証实了这个 β-构型[66]。脫氧鳥嘌呤核苷中苷鍵的构型未曾被研究过，但是鉴于脫氧腺嘌呤核苷、脫氧胞嘧啶核苷和胸腺嘧啶核苷等的 β-构型已經被証实，Andersen、Hayes、Michelson 和 Todd[1] 实际上肯定地认为所有天然的脫氧核糖核苷都具有 β-构型。

胞嘧啶核苷[64]和 5′-溴-5′-脫氧胸腺嘧啶核苷[66]的結构曾經

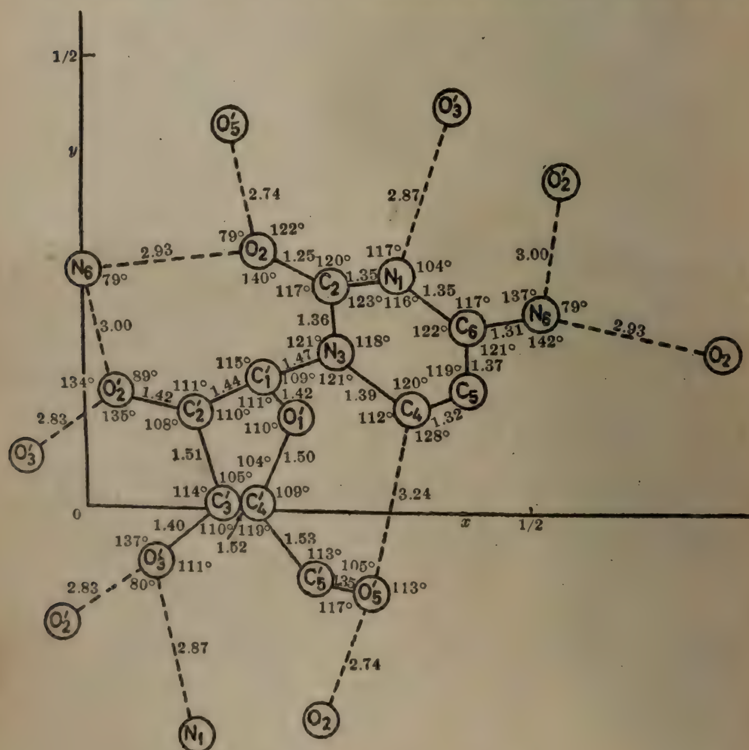


图 24 胞嘧啶核苷的結构

(S. Furberg: *Acta Cryst.* 1950, 3, 329 頁)

用 X-射綫方法加以測定。腺嘌呤核苷、鳥嘌呤核苷和尿嘧啶核苷[73]以及胸腺嘧啶核苷和脫氧胞嘧啶核苷[20]的初步研究也曾經进行过。Furberg[64] 所提供的胞嘧啶核苷的結构表示在图 24。

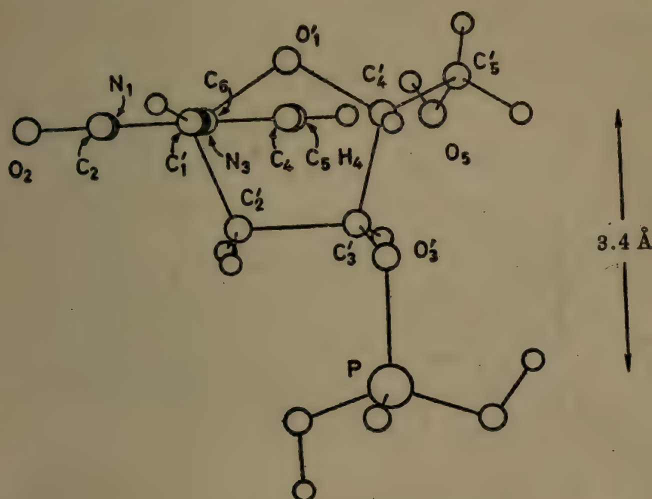


图 25　一个嘧啶核苷酸的結构
(S. Furberg: *Acta chem. scand.* 1952, **6**, 635 頁)

这个結构証实了 D-核糖的呋喃糖結构、$N_{(3)}$ 上糖殘基的位置和苷鍵的 β-构型。胸腺嘧啶核苷中的这些結构細节亦曾被 Huber[66] 从 5'-溴-5'-脫氧衍生物的結构的測定加以証实(图 26)。关于核酸結构的其他重要知識亦从这些結构中得到。嘧啶环中的六个原子是在同一平面上，这与 Clews 和 Cochran[21,22] 以及 Pitt[24] 的观察結果相一致。核糖殘基和脫氧核糖殘基中的 $C'_{(1)}$、$O'_{(1)}$、$C'_{(2)}$ 和 $C'_{(4)}$ 原子差不多都在一个平面上，但在核糖中，$C'_{(3)}$ 原子則突出这个平面外約 0.5Å。在胞嘧啶核苷中 $N_{(3)}—C'_{(1)}$ 鍵的长度为 1.47Å，而在胸腺嘧啶核苷的衍生物中 $N_{(3)}—C'_{(1)}$ 鍵的长度則为 1.55Å，因此这两个鍵都是单鍵。在这两个核苷中，两个鍵間都具有这样的鍵角(参看图 24 和 25)，使嘧啶环几乎垂直于糖的主要平面。这个观察对核酸結构的认識有极重要的意义，尤其鉴

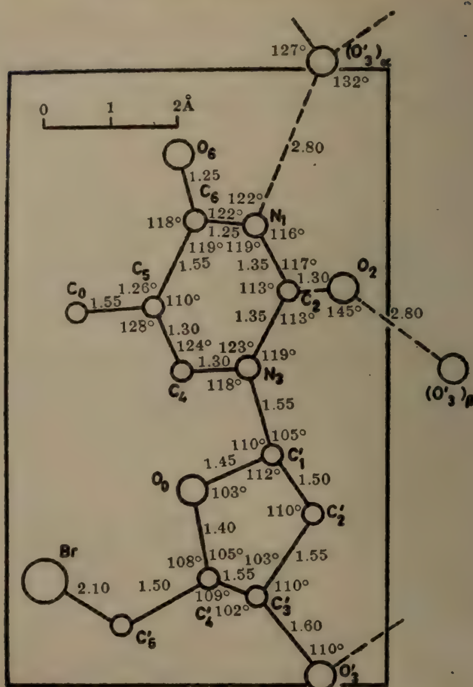


图 26 5′-溴-5′-脱氧胸腺嘧啶核苷的結构
(M. Huber: *Acta Cryst*. 1957, **10**, 131 頁)

于过去所作的假定认为两个环是相互平行的。

从尿嘧啶核苷和胞嘧啶核苷在分子大小上的类似点出发[73]，可以肯定这两个分子的立体化学是相同的。研究腺嘌呤核苷所得的結果[73]不足以画出一个分子投影，象胞嘧啶核苷的分子投影那样，但无論如何这些結果已足以証实苷鍵的位置和构型。从分子大小的相似，Furberg 认为鳥嘌呤核苷和腺嘌呤核苷有相似的結构。

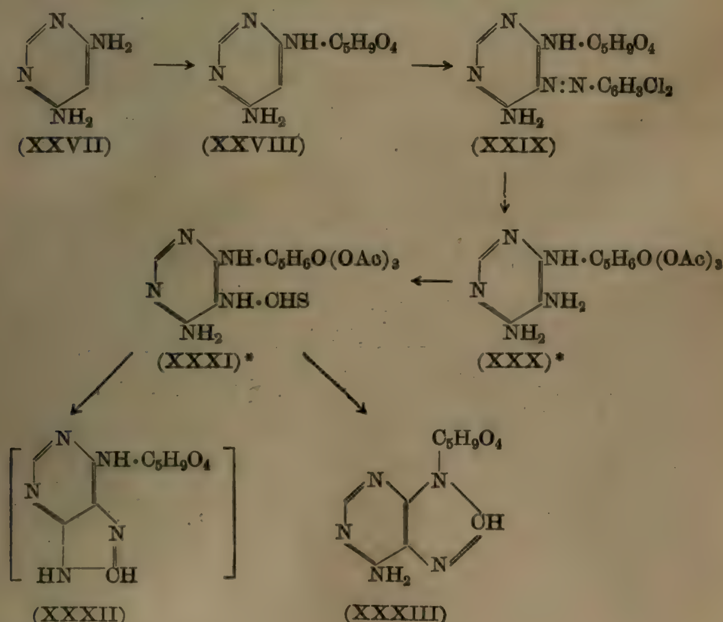
核苷的合成[78]

1914 年 Emil Fischer 及其同工者[79~82]用适当的嘌呤碱和嘧啶碱的取代物与乙酰卤糖类作用首先合成了嘌呤和嘧啶核苷。这

个方法以后被 Levene[83~85] 和 Hilbert 以及他們的同工者[86~89]应用于各种嘌呤和嘧啶糖苷的合成。但是在这些工作者中，沒有一个成功地合成出一个天然的核苷，最接近于成功的成就为 Hilbert 和Rist 的工作[89]，他們合成了 3-尿嘧啶-D-吡喃核糖苷。自从1944年以后，Todd 及其同工者才成功地实現了所有核糖核苷和嘧啶脱氧核糖核苷的合成。

嘌呤核糖核苷的合成

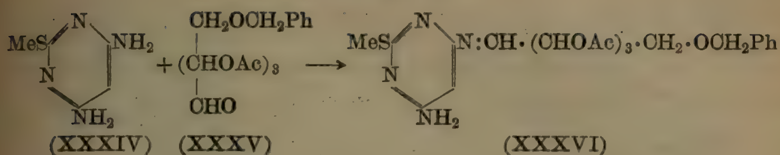
合成嘌呤核苷曾用两种普通方法加以尝試。第一种合成方法包括制备一个嘧啶苷或制备一个咪唑苷，然后构成第二个环以完成嘌呤核。这是 Traube 合成腺嘌呤的一般方法的改进[90,91]。将4,6-二氨基嘧啶 (XXVII) 与一个戊糖（或已糖）在乙醇中在酸性催化剂的存在下加热縮合使其变成适当的 6-氨基-4-苷氨基嘧啶 (XXVIII)。反应进行时要使所释出的水不断除去[92]。将这个化合

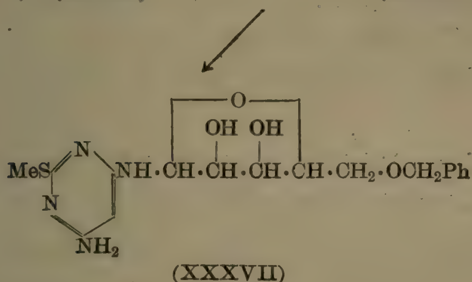


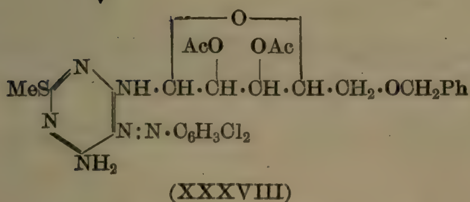
* 原书誤，已改正（譯者注）

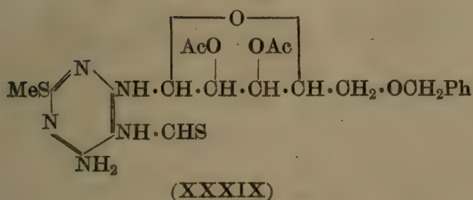
物与从对-氯苯胺或2,5-二氯苯胺所得的重氮盐在中性或弱碱性溶液中偶合,使生成結晶的偶氮化合物(XXIX)[93]。将其中糖羥基乙酰化,偶氮基还原成氨基,使生成乙酰化的4,5-二氨基-6-苷氨基嘧啶(XXX)。这个化合物在与二硫甲酸鈉的水溶液作用时卽变成相应的5-硫甲酰氨基嘧啶(XXXI)。在干的吡啶中将其加热时卽发生环合作用,而生成6-苷氨基嘌呤(XXXII)和所需要的9-苷基腺嘌呤(XXXIII)的混合物[94]。这两个化合物可以根据前者溶解于碱液中而后者不溶解于碱液中的性能而立卽加以分离,还可以利用后一化合物容易脫氨变成相应的9-苷基次黄嘌呤而加以区别。在分离的前后都能发生去乙酰基作用。用这个合成方法所得到的嘌呤苷的产量可因使硫甲酰氨基嘧啶在酒精醇淦溶液中环合而增加[95]。这个一般的合成方法曾被应用于9-D-吡喃木糖苷基-[96]、9-D-吡喃核糖苷基-[97]、9-D-吡喃甘露糖苷基-[75]和9-D-吡喃葡萄糖苷基腺嘌呤[98],9-D-吡喃木糖苷基-2-甲硫基腺嘌呤[99]以及9-D-吡喃葡萄糖苷基异鳥嘌呤[100]的制备。毫无疑問,用这种合成方法所制成的化合物,其糖苷殘基是在9位上。这个鍵的β-构型是根据理論的推理和光学的証据而来的。上面的这些化合物因而都是9-β-糖苷[74,75,101]。

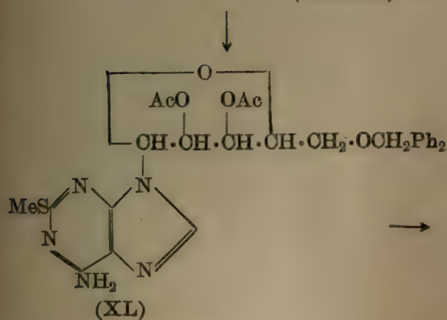
由上面的合成方法所得到的糖苷具有吡喃糖的結构。但是,所有天然的核糖核苷却具有呋喃糖的結构。因此若要合成它們,必須把这个方法加以改进。Kenner、Taylor 和 Todd[102] 将2,3,4-三乙酰-5-苄基-D-核糖(XXXV)与4,6-二氨基-2-甲硫嘧啶(XXXIV)在含有氯化銨的甲醇中縮合,使产生一个 Schiff 碱(XXXVI),从而完成腺嘌呤核苷的合成。在醛糖中必須有5-苄基存在,以防止呋喃糖-吡喃糖的互相轉变,直到嘌呤的咪唑环閉合时为止[103,104];为了增加氨基嘧啶的反应性能,分子中必須有2-甲硫基存在。Schiff 碱的乙酰基可用甲醇氨溶液除去,使生成苷(XXXVII)幷与重氮化的2,5-二氯苯胺偶合。将此粗制的偶氮化合物乙酰化(XXXVIII),用层析法純化,幷用鋅粉和醋酸加以还原。所得的5-氨基化合物直接加以硫甲酰化。所成的硫甲酰基苷

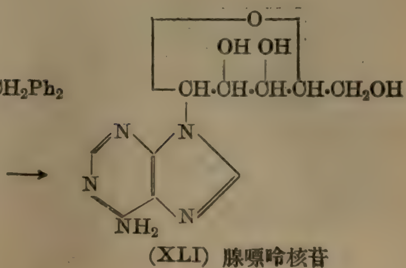

MeS
N
N
NH2
NH2
CH2OCH2Ph
+(CHOAc)3
CHO
N:CH·(CHOAc)3·CH2·OCH2Ph
(XXXIV)
(XXXV)
(XXXVI)


O
OH OH
MeS
N
NH·CH·CH·CH·CH·CH2·OCH2Ph
NH2
(XXXVII)


O
AcO OAc
MeS
N
NH·CH·CH·CH·CH·CH2·OCH2Ph
N:N·C6H3Cl2
NH2
(XXXVIII)


O
AcO OAc
MeS
N
NH·CH·CH·CH·CH·CH2·OCH2Ph
NH·CHS
NH2
(XXXIX)

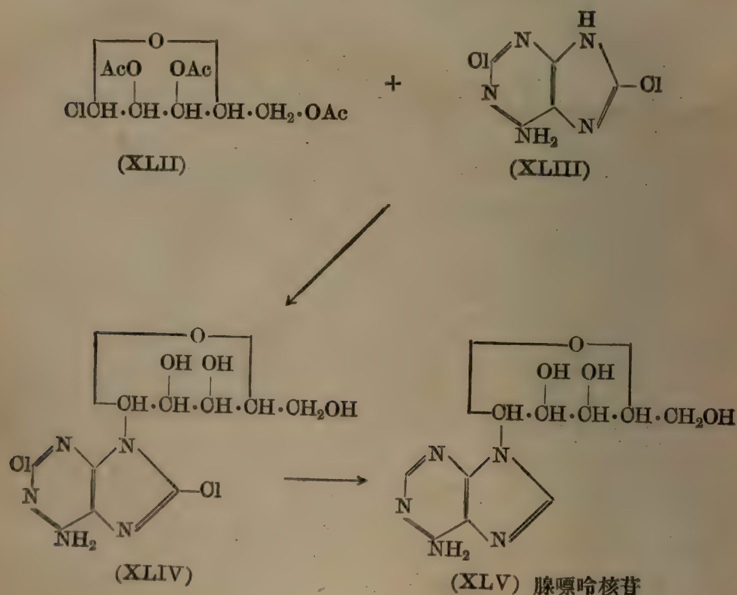

O
AcO OAc
CH·CH·CH·CH·CH2·OCH2Ph2
MeS
N
NH2
(XL)


O
OH OH
CH·CH·CH·CH·CH2OH
N
NH2
(XLI) 腺嘌呤核苷

(XXXIX)則用甲醇鈉使其环合，以生成嘌呤苷(XL)。2-甲硫基和5′-苄基可用 Raney 鎳氫解使其同时除去。所得的产物經去乙酰基后即得到腺嘌呤核苷(9-β-D-呋喃核糖基腺嘌呤)(XLI)。这个产物和从酵母核糖核酸中所得到的天然核苷相同。

从咪唑类开始以代替嘌呤碱作为嘌呤核苷的合成亦曾被尝試过[105,106]。这个方法只限于黃嘌呤苷的合成而黃嘌呤核苷曾經用此法合成过[107]。

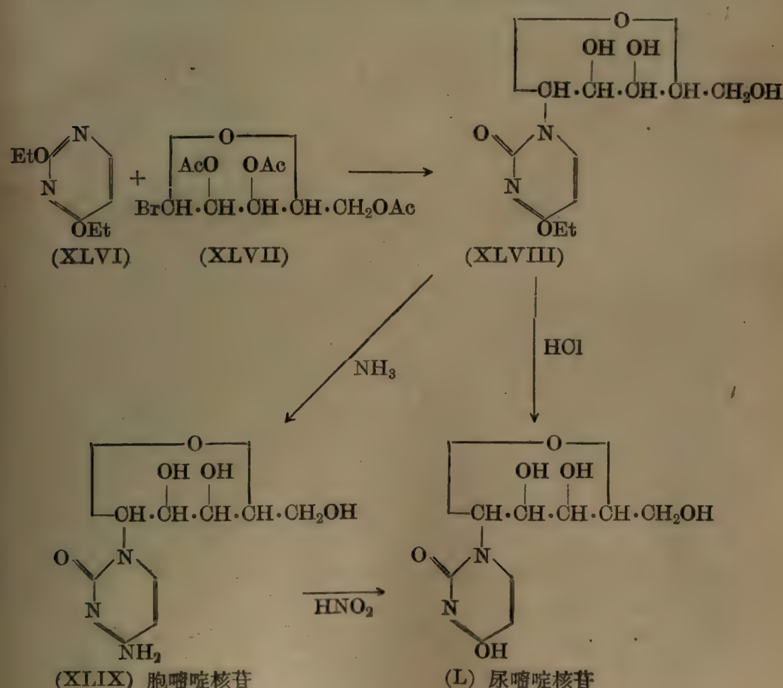
Davoll、Lythgoe 和 Todd[108] 所发展的第二种一般合成方法是 Fischer 和 Helferich[79] 的原来方法的改良法。在这个方法中，一个适当嘌呤取代物的銀盐与乙酰卤糖类进行反应。要将这个方法应用于天然核糖核苷的合成，就必須采用卤乙酰呋喃核糖。这个化合物是用 Howard、Lythgoe 和 Todd[109] 的方法制成的。将 Bredereck、Köthnig 和 Berger[110] 首先所制备的1,2,3-三乙酰-5-三苯甲基-D-核糖先用氫解方法除去三苯甲基，使其变为1,2,3-三乙酰-D-呋喃核糖，然后通过乙酰化作用变为1,2,3,5-四乙



酰-D-呋喃核糖。所得产物随即用溶于无水乙醚中的氯化氢处理，使之变为粗制的糊状氯乙酰-D-呋喃核糖(XLII)，再与2,8-二氯腺嘌呤银(XLIII)作用，并将产物中的乙酰基除去，则生成2,8-二氯-9-β-D-呋喃核糖苷(XLIV)。在附有钯的硫酸钡存在下并在氢氧化钠水溶液中将(XLIV)氢化，则得到9-β-D-呋喃核糖基腺嘌呤(XLV)，这和从酵母核糖核酸中所得的腺嘌呤核苷相同。用同样的方法也曾制备了鳥嘌呤核苷[111]。

嘧啶核糖核苷的合成

合成嘧啶核苷的方法和前述合成嘌呤核苷的第二个方法相类似。这个合成方法也包含一个适当的嘧啶取代物与乙酰卤糖的反应。早先的研究者采用某些含有羥基等取代基的嘧啶衍生物。由于这些取代基具有质子移变能力，苷基遂与之連結在一起。这个困难被 Hilbert 及其同工者所克服，他們采用了2, 6-二烴氧基嘧

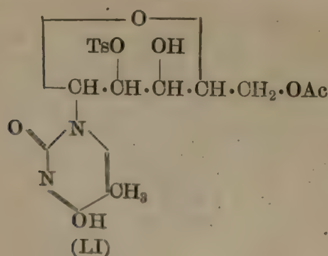


(XLIX) 胞嘧啶核苷 (L) 尿嘧啶核苷

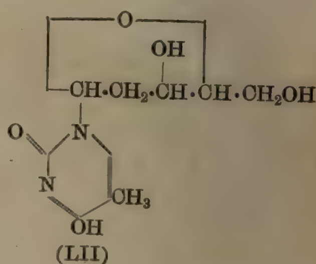
啶，因而排除了互变异构的可能性[86,87]。当将溴乙酰-D-呋喃核糖(XLVII)与2,6-二乙氧基嘧啶(XLVI)[109]作用时则得到一个产物(XLVIII)，这个产物經甲醇的氨溶液处理后則生成一种碱类物质的混合物，从其中用重結晶方法可将胞嘧啶核苷(XLIX)分离出来，这和天然的胞嘧啶核苷相同。胞嘧啶核苷經脫氨后就生成尿嘧啶核苷(L)(另外若从开始反应时所生成的产物用盐酸处理亦得到尿嘧啶核苷)。由 Howard、Lythgoe 和 Todd[109] 合成的这个胞嘧啶核苷是第一个合成的天然核苷。

脫氧核糖核苷的合成

最近曾有人叙述了胸腺嘧啶核苷和2′-脫氧尿嘧啶核苷，即天然脫氧核糖核酸的嘧啶核苷的合成[112,113]。将3-β-D-呋喃核糖苷基胸腺嘧啶(或尿嘧啶衍生物)通过2′,3′-亚异丙基衍生物的生成变为5′-乙酸盐。产物經甲苯-对-磺酰化作用后即得到5′-乙酰-2′-甲苯-对-磺酰核糖苷基胸腺嘧啶(LI)，再用碘化鈉处理后即得到2′-脫氧-2′-碘化物。这个碘合物在催化剂鈀的存在下氫化，并除去乙酰基后則得到胸腺嘧啶核苷(LII)。



(LI)



(LII)

(汪禮經 譯)

参 考 文 献

[1] Andersen, W., Hayes, D. H., Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1954, p. 1882

[2] Dekker, C. A. and Todd, A. R. *Nature, Lond.* 1950, **166**, p. 557

[3] Schulze, E. and Bosshard, E. *Z. physiol. Chem.* 1885, **9**, p. 443; 1886, **10**,

p. 80
[4] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1909, **42**, pp. 2473, 2477
[5] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1909, **42**, p. 2703
[6] Kossel, A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1885, **18**, p. 79
[7] Kossel, A. *Z. physiol. Chem.* 1886, **10**, p. 248
[8] Fischer, E. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1897, **30**, p. 2226
[9] Levene, P. A. and Bass, L. W. *Nucleic Acids*: Chemical Catalog Company, New York, 1931, p. 169
[10] Levene, P.A. and London, E. S. *J. biol. Chem.* 1929, **81**, p. 711; 1929, **83**, p. 793
[11] Klein, W. *Hoppe-Seyl. Z.* 1934, **224**, p. 244; 1938, **255**, p. 82
[12] Johnson, T. B. and Coghill, R. D. *J. Amer. chem. Soc.* 1925, **47**, p. 2838
[13] Hotchkiss, R. D. *J. biol. Chem.* 1948, **175**, p. 315
[14] Wyatt, G. R. *Biochem. J.* 1951, **48**, p. 584
[15] Hurst, R. O., Marko, A. M. and Butler, G. C. *J. biol. Chem.* 1953, **204**, p. 847
[16] Brawerman, G. and Chargaff, E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 4052
[17] Marshak, A. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1951, **37**, p. 299
[18] Wyatt, G. R. and Cohen, S. S. *Nature, Lond.* 1952, **170**, p. 1072
[19] Wyatt, G. R. and Cohen, S. S. *Biochem. J.* 1953, **55**, p. 774
[20] Furberg, S., Hordvik, A. and Tangbøl, K. *Acta chem. scand.* 1956, **10**, p. 135
[21] Clews, C. J. B. and Cochran, W. *Acta Cryst.* 1948, **1**, p. 4
[22] Clews, C. J. B. and Cochran, W. *Acta Cryst.* 1949, **2**, p. 46
[23] Schneider, W. C. *J. Amer. chem. Soc.* 1948, **70**, p. 627
[24] Pitt, G. J. *Acta Cryst.* 1948, **1**, p. 168
[25] Loofbourow, J. R., Stimson, M. M. and Hart, M. J. *J. Amer. chem. Soc.* 1943, **65**, p. 148
[26] Stimson, M. M. and Reuter, M. A. *J. Amer. chem. Soc.* 1943, **65**, p. 151; 1945, **67**, pp. 847, 2191
[27] Stimson, M. M. *J. Amer. chem. Soc.* 1949, **71**, p. 1470
[28] Marshall, J. R. and Walker, J. *J. chem. Soc.* 1951, p. 1004
[29] Bernal, J. D. and Crowfoot, D. *Nature, Lond.* 1934, **131**, p. 911
[30] Broomhead, J. M. *Acta Cryst.* 1948, **1**, p. 324
[31] Broomhead, J. M. *Acta Cryst.* 1951, **4**, p. 92
[32] Cochran, W. *Acta Cryst.* 1951, **4**, p. 81
[33] Hammarsten, O. *Z. physiol. Chem.* 1894, **19**, p. 19
[34] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1909, **42**, pp.

1198, 3247

[35] van Ekenstein, W. A. and Blanksma, J. J. *Chem. Weekbl.* 1913, **10**, p. 664

[36] Fischer, E. and Piloty, O. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1891, **24**, p. 4214

[37] Gulland, J. M. and Barker, G. R. *J. chem. Soc.* 1943, p. 625

[38] Gulland, J. M. *J. chem. Soc.* 1944, p. 208

[39] Barker, G. R., Cooke, K. R. and Gulland, J. M. *J. chem. Soc.* 1944, p. 339

[40] Barker, G. R., Farrer, K. R. and Gulland, J. M. *J. chem. Soc.* 1947, p. 21

[41] Levene, P. A. and Mori, T. *J. biol. Chem.* 1929, **83**, p. 803

[42] Levene, P. A., Mikeska, L. A. and Mori, T. *J. biol. Chem.* 1930, **85**, p. 785

[43] Laland, S. G. and Overend, W. G. *Acta chem. scand.* 1954, **8**, p. 192

[44] Jones, A. S. and Laland, S. G. *Acta chem. scand.* 1954, **8**, p. 603

[45] Deriaz, R. E., Overend, W. G., Stacey, M., Teece, E. G. and Wiggins, L. F. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1879

[46] Kent, P. W., Stacey, M. and Wiggins, L. F. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1232

[47] Walker, I.G. and Butler, G. C. *Canad. J. Chem.* 1956, **34**, p. 1168

[48] Levene,P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1932, **94**, p. 809; 1932, **97**, p. 491

[49] Levene, P. A. and Stiller, E. T. *J. biol. Chem.* 1933, **102**, p. 187

[50] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1933, **101**, p. 529

[51] Bredereck, H. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1932, **65**, p. 1830; 1933, **66**,p. 198

[52] Bredereck, H. *Hoppe-Seyl. Z.* 1934, **223**, p. 61

[53] Bredereck, H., Berger, E. and Ehrenberg, J. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1940, **73**, p. 269

[54] Bredereck, H. and Berger, E. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1940, **73**, p. 1124

[55] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1934, **105**, p. 419; 1935, **109**, p. 623

[56] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1937, **121**, p. 131

[57] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1934, **106**, p. 113; 1935, **111**, p. 313

[58] Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1944, p. 592

[59] Brown, D. M. and Lythgoe, B. *J. chem. Soc.* 1950, p. 1990

[60] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1910, **43**, p. 3150

[61] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1935, **104**, p. 385

[62] Levene, P. A. and Bass, L. W. *Nucleic Acids*: Chemical Catalog Company, New York, 1931, p. 146

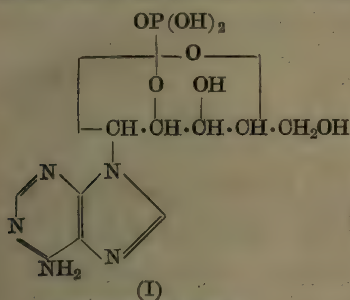
[63] Levene, P. A. *J. biol. Chem.* 1925, **63**, p. 653
[64] Furberg, S. *Nature, Lond.* 1949, **164**, p. 22; *Acta Cryst.* 1950, **3**, p. 325
[65] Bredereck, H., Müller, G. and Berger, E. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1940, **73**, p. 1058
[66] Huber, M. *Acta Cryst.* 1957, **10**, p. 128
[67] Gulland, J. M. and Holiday, E. R. *J. chem. Soc.* 1936, p. 765
[68] Gulland, J. M. and Macrae, T. F. *J. chem. Soc.* 1933, p. 662
[69] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1935, **111**, p. 313; see also Levene, P. A. *J. biol. Chem.* 1928, **55**, p. 437
[70] Gulland, J. M. and Story, L. F. *J. chem. Soc.* 1938, p. 692
[71] Gulland, J. M., Holiday, E.R. and Macrae, T. F. *J. chem. Soc.* 1934, p. 1639
[72] Gulland, J. M. and Story, L. F. *J. chem. Soc.* 1938, p. 259
[73] Furberg, S. *Acta chem. scand.* 1950, **4**, p. 751
[74] Davoll, J., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1944, p. 833
[75] Lythgoe, B., Smith, H. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1947, p. 355
[76] Clark, V. M., Todd, A. R. and Zussman, J. *J. chem. Soc.* 1951, p. 2952
[77] Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1955, p. 816
[78] Baddiley, J. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 149
[79] Fischer, E. and Helferich, B. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1914, **47**, p. 210
[80] Fischer, E. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1914, **47**, p. 1377
[81] Fischer, E. and von Fodor, K. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1914, **47**, p. 1058
[82] Fischer, E., Helferich, B. and Ostmann, P. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1920, **53**, p. 873
[83] Levene, P. A. and Sobotka, H. *J. biol. Chem.* 1925, **65**, p. 463
[84] Levene, P. A. and Compton, J. *J. biol. Chem.* 1936, **114**, p. 9; 1937, **117**, p. 37
[85] Levene, P. A. and Cortese, F. *J. biol. Chem.* 1931, **92**, p. 53
[86] Hilbert, G. E. and Johnson, T. B. *J. Amer. chem. Soc.* 1930, **52**, p. 4489
[87] Hilbert, G. E. and Jansen, E. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1936, **58**, p. 60
[88] Hilbert,G. E. *J. biol. Chem.* 1937, **117**, p. 331
[89] Hilbert, G. E. and Rist, C. E. *J. biol. Chem.* 1937, **117**, p. 371
[90] Baddiley, J., Lythgoe, B., McNeil, D. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1943, p. 383
[91] Baddiley,J., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1943, p. 386
[92] Baddiley, J., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1943, p. 571
[93] Lythgoe, B., Todd, A. R. and Topham, A. *J. chem. Soc.* 1944, p. 315
[94] Baddiley, J., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1944, p. 318

[95] Kenner, G. W. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1946, p. 852
[96] Kenner, G. W., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1944, p. 652
[97] Baddiley, J., Kenner, G. W., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1944, p. 657
[98] Holland, A., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1948, p. 965
[99] Howard, G. A., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1945, p. 556
[100] Andrews, K. J. M., Anand, N., Todd, A. R. and Topham, A. *J. chem. Soc.* 1949, p. 2490
[101] Howard, G. A., Kenner, G. W., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1946, pp. 855, 861
[102] Kenner, G. W., Taylor, C. W. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1620
[103] Kenner, G. W., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1948, p. 957
[104] Kenner, G. W., Rodda, H. J. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1613
[105] Baxter, R. A. and Spring, F. S. *J. chem. Soc.* 1947, p. 378
[106] Baxter, R. A., McLean, A. C. and Spring, F. S. *J. chem. Soc.* 1948, p. 523
[107] Howard, G. A., McLean, A. C., Newbold, G. T., Spring, F. S. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1949, p. 232
[108] Davoll, J., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1948, p. 967
[109] Howard, G. A., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1947, p. 1052
[110] Bredereck, H., Köthnig, M. and Berger, E. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1940, 73, p. 956
[111] Davoll, J., Lythgoe, B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1948, p. 1685
[112] Brown, D. M., Parihar, D. B., Todd, A. R. and Varadarajan, S. *J. chem. Soc.* 1958, p. 3028
[113] Brown, D. M., Parihar, D. B., Reese, C. B. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1958, p. 3035

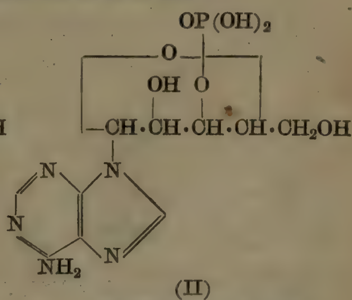
第六章 核苷酸的結构及其合成

引 言

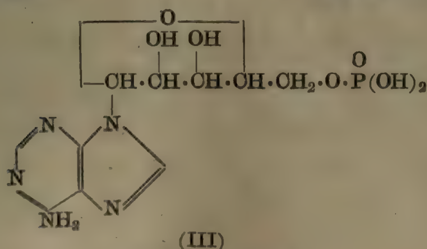
核苷酸是核苷的磷酸酯。核酸的单体結构单位就是核苷的单磷酸酯。二磷酸酯可以从糖的第二个羥基用第二个磷酸分子磷酸化或通过焦磷酸的形成而得到。在三磷酸酯中一般都含有一个或两个焦磷酸鍵。在核糖核苷酸中,即核糖核苷的单磷酸酯中,磷酸基团可以連在糖的 2′-、3′-或 5′-位置上。但是在脫氧核糖核苷酸中則只有 3′-和 5′-的位置可以与磷酸結合。所有这些异构体都曾經从核酸的酶促水解或化学方法水解的产物中分离出来。下面是以腺嘌呤核苷酸为例的五个已知的核苷酸的結构:



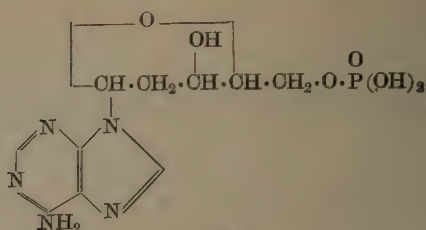
(I)
腺嘌呤核苷-2′-磷酸
腺嘌呤核苷酸(a)



(II)
腺嘌呤核苷-3′-磷酸
腺嘌呤核苷酸(b)

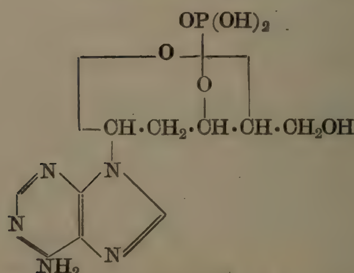


(III)
腺嘌呤核苷-5′-磷酸
肌肉腺嘌呤核苷酸



(IV)

脫氧腺嘌呤核苷-5′-磷酸

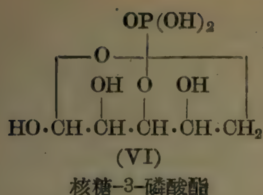


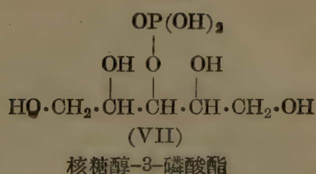
(V)

脫氧腺嘌呤核苷-3′-磷酸

核糖核苷酸的异构現象

多年来一般都认为用化学方法水解酵母核糖核酸时，从水解产物中只能分离出四种不同的核苷酸。Levene 和 Harris[1~3] 研究了酵母腺嘌呤核苷酸分子中的磷酸基团的位置。他們使腺嘌呤核苷酸脫氨成为次黄嘌呤核苷磷酸，再經水解就很快地变成次黄嘌呤和核糖磷酸酯[3]，因而确定了磷酸的位置是在糖基部分而不是在嘌呤环上。这个核糖磷酸酯和核糖-5-磷酸酯不同，因此腺嘌呤核苷酸的可能結构就只局限在腺嘌呤核苷-2′-和腺嘌呤核苷-3′-磷酸（I 和 II）两者之間。将这个核糖磷酸酯催化还原[2] 就得到沒有旋光性的核糖醇磷酸酯（VII）。这表明如果腺嘌呤核苷酸是一种单純的化合物，并且在水解和还原时磷酸基团都沒有移位，則这个核糖磷酸酯应当是核糖-3-磷酸酯（VI），因而原来的腺嘌呤核苷酸是腺嘌呤核苷-3′-磷酸。


(VI)
核糖-3-磷酸酯


(VII)
核糖醇-3-磷酸酯

由鳥嘌呤核苷酸所得到的核糖磷酸酯被认为是和来自腺嘌呤核苷酸的核糖磷酸酯相同，因此鳥嘌呤核苷酸也被认为是-3′-磷酸[1]。用类推方法也可推想到嘧啶核苷酸也是-3′-磷酸。Michelson 和 Todd[4] 通过确切的核苷-3′-磷酸的合成企图証明这些結論，他們得到了和天然产物完全相同的腺嘌呤核苷酸和尿嘧啶核苷酸。但是，在所采用的合成路綫中有中間产物亚苄基核苷生成；这个化合物曾被誤认为是 3′,5′-亚苄基衍生物[5,6]。現在 Brown、Haynes 和 Todd[7] 已經証明这些衍生物是 2′,3′-亚苄基衍生物，因此 Michelson 和 Todd[4] 所合成的核苷酸就不能被确定是-3′-磷酸，因为它們也同样可能是-2′-磷酸。曾經用直接磷酰化方法将亚苄基衍生物用于制备核苷酸[4,8,9]。这些核苷酸原先被认为是-2′-磷酸，而現在应当看作是-5′-磷酸。

象在第四章中所描述的，在核糖核酸的化学水解产物中实际上含有 8 种不同的核苷酸，而不是 4 种。这 8 种核苷酸組成 4 对的两种异构体，Carter 和 Cohn[10] 称之为 *a* 异构体和 *b* 异构体。因此从核糖核酸的化学水解产物中所得到的腺嘌呤核苷酸，不象当初所想象的仅是一种单純的化合物，而是腺嘌呤核苷酸 *a* 和腺嘌呤核苷酸 *b* 的混合物。这两种异构体可以用离子交换、紙层析和紙电泳方法加以分离和提取出来(参看第四章)。要确切指明核酸中核苷酸間連接的位置，就必須准确地測定核苷酸异构体的結构。曾經对这两种异构体进行了广泛的研究，这些研究因腺嘌呤核苷酸 *a* 和尿嘧啶核苷酸 *a* 的确切合成而达到了頂点。

Carter 和 Cohn[10] 将腺嘌呤核苷酸异构体 *a* 和 *b* 降解为腺嘌呤和腺嘌呤核苷，并且指出它們分别是腺嘌呤核苷-2′-磷酸和腺嘌呤核苷-3′-磷酸。Carter 和 Cohn 根据酶促水解和化学水解

的研究証据擯除了异构体中的一个是腺嘌呤核苷-5′-磷酸的可能性。Brown、Haynes 和 Todd[7] 也証明了这一点，并且指出这两种异构体对过碘酸的氧化作用都是稳定的，而腺嘌呤核苷-5′-磷酸則不然。

磷酸基团位置的不同不是惟一可能的异构现象。Carter[11] 提出另一个可能性，即这两种核苷酸都可能是-3′-磷酸，它們可能由于在苷鍵上的 α-β-异构现象而引起差异。这种可能性似乎因 Doherty[12] 的工作而受到贊許，他从 a 和 b 异构体制备核糖醇磷酸酯时重复了 Levene 和 Harris[2] 对这两种腺嘌呤核苷酸异构体(同样也对鳥嘌呤核苷酸异构体)[2] 的工作，并指出这两者都沒有旋光性，从而表明它們都是从-3′-磷酸衍生而来的。但是从核酸中只能分离出一种具有 β 构型的腺嘌呤核苷。如果 a 和 b 异构体在苷鍵上具有不同的构型，則核苷酸分子上的异构现象应当在核苷的异构现象中反映出来。并且，这两种 a 和 b 异构体在稀酸溶液中迅速互变，产生一个两种异构体的平衡混合物[13, 14]。这样的互变不象是由于 α-β-异构化作用所产生，因为如果是这样的話，則其中比較稳定的一种异构体应当含量較多，而且异构化作用将伴随着有呋喃糖-吡喃糖的变化，但是并沒有观察到这些现象。

根据上述的論証，Brown 和 Todd[13] 认为从苷鍵的不同构型所引起的异构现象的可能性是最不可信的。Brown 和 Todd[13] 根据对腺嘌呤核苷酸 a 和 b 混合物的合成支持了这一观点。他們将5′-三苯甲基腺嘌呤核苷用二苄基氯磷酸加以磷酸化，然后用乙酸除去三苯甲基和苄基，再加以氫化，就得到两种腺嘌呤核苷酸的混合物。这两种腺嘌呤核苷酸用紙层析和离子交换层析方法加以分离，然后与从酵母核糖核酸提取出来的天然腺嘌呤核苷酸异构体比較其离子交换和紙层析行为、X-射綫粉末摄影以及紅外光譜，从而鉴定其为腺嘌呤核苷酸 a 和腺嘌呤核苷酸 b。根据这些証据，似乎可以肯定腺嘌呤核苷酸 a 和 b 这两种异构体是腺嘌呤核苷-2′- 和 -3′-磷酸，虽然异构体 a 不一定就是-2′-磷酸，异构体 b 也不一定就是-3′-磷酸。这似乎也可以合理地假定，在其他核苷酸

中异构現象也是属于同一类型的。Loring、Hammell、Levy 和 Bortner[15] 对胞嘧啶核苷酸 a 和 b 得到相似的結論，因为用酶除去磷酸时只产生一个相同的核苷，卽胞嘧啶核苷。

余下的問題是鉴定腺嘌呤核苷酸 a 究竟是-2′-还是-3′-磷酸，或对其他核苷酸解决类似的問題。Cavalieri[16] 測定了胞嘧啶核苷酸和腺嘌呤核苷酸 a 和 b 异构体溶液的密度，幷发現在所有濃度下异构体 b 溶液的密度都比异构体 a 溶液的密度大。由于双极离子中荷电基团距离的增加而使其水溶液的密度也有所增加[17]〔由于溶剂电縮作用（electrostriction）的增加〕，因此断定异构体 b 中的荷电基团間的距离較远。根据已知的胞嘧啶核苷的結构（第五章；图 24），这就証明 b 酸是 -3′-磷酸。

用相应氨基的 pK'_a 値也支持了这一观点。胞嘧啶核苷酸的 a 和 b 异构体的氨基的 pK'_a 値分别为 4.36 和 4.28，腺嘌呤核苷酸的 a 和 b 异构体的氨基的 pK'_a 値則分别为 3.81 和 3.74。后者的数値与 Alberty、Smith 和 Bock[18] 所提出的数値 3.80 和 3.65 以及 Kuna[19] 所提出的数値 3.79 和 3.56 相当符合。理論上，电荷相距較远的-3′-磷酸异构体应具有較低的 pK'_a 値[20]。也曾从紫外吸收光譜随 pH 値的改变的性质[21]研究了糖羥基在 pH 12～14 范圍內的电离現象。假設在这个范圍內是2′-羥基在进行解离，則可以认为上述結果支持了上面的結論。此外也試用磺酸型树脂使腺嘌呤核苷酸 a 和 b 水解来研究这个問題。但是，不論用那一种酸都产生了核糖-2′- 和 -3′-磷酸酯的混合物，因此显然在水解过程中发生了磷酸基团的移位[22]。

比較了脫氧胞嘧啶核苷-3′-磷酸的紅外光譜和胞嘧啶核苷酸 a 和 b 的紅外光譜之后，就进一步証明了 a 和 b 异构体是-2′- 和 -3′-磷酸[23]。脫氧胞嘧啶核苷-3′-磷酸的紅外光譜与 b 异构体的紅外光譜相似而与 a 异构体的不同就再一次有力地說明 b 异构体就是-3′-磷酸。

虽然关于証实核苷酸异构体的所有上述証据都互相符合，但詳細和可靠的化学合成的証实还是必要的。Brown、Fasman、

Magrath 和 Todd[24] 对腺嘌呤核苷-2'-磷酸的合成与 Brown、Todd 和 Varadarajan[25] 对尿嘧啶核苷-2'-磷酸的合成提供了这样的証明。腺嘌呤核苷-2'-磷酸的合成如下。5'-乙酰腺嘌呤核苷經乙酰化[7]后产生乙酰腺嘌呤核苷、二乙酰腺嘌呤核苷和三乙酰腺嘌呤核苷的混合物，其中只有一个結晶状态的二乙酰腺嘌呤核苷可被分离出来。用O-苄基磷OO-二苯基磷酐使二乙酰腺嘌呤核苷磷酰化可得到二乙酰腺嘌呤核苷苄基亚磷酸。将此产物与 N-氯丁二酰亚胺作用，继以用含水吡啶进行极温和的水解，則得到二乙酰腺嘌呤苄基氢磷酸。再經加氢和去乙酰基后卽可得到核苷酸。这个最后的产物通过与眞正样品的比較而証明其为腺嘌呤核苷酸 *a*[26]。

这个合成的意义在于只生成腺嘌呤核苷酸 *a*，而一点 *b* 异构体也沒有。因此 *a* 异构体結构的关鍵在于原先的二乙酰腺嘌呤核苷的結构，因为所留下的空位必然是和 *a* 的基团相适应。若使在腺嘌呤核苷酸 *a* 中的呋喃核糖部分的磷酸基团的位置用 *a* 表示，而在 *b* 异构体中的位置用 *b* 表示，則所用的二乙酰腺嘌呤核苷是 *b*, 5'-二乙酰腺嘌呤核苷。若将其与甲苯-对-磺酰氯作用然后除去乙酰基，則得到 *a*-甲苯-对-磺酰腺嘌呤核苷。将此核苷甲基化后再除去甲苯-对-磺酰基，继以水解，便能获得几种甲基化的糖的混合物。色层分析証明它們是 5-甲基-、3-甲基-和 4-甲基核糖以及 3, 5-二甲基核糖的混合物。完全不含有在 2-位上带甲基的任何衍生物只能表明 *a*-甲苯-对-磺酰腺嘌呤核苷就是 2'-甲苯-对-磺酰腺嘌呤核苷；也就是說 2'-位置相当于 *a* 的位置。因此腺嘌呤核苷酸 *a* 就是腺嘌呤核苷-2'-磷酸，而腺嘌呤核苷酸 *b* 就是腺嘌呤核苷-3'-磷酸。

尿嘧啶核苷酸 *a*[25] 的合成遵循着相似的合成途徑，但是相应的二乙酰尿嘧啶核苷的結构的証明却因二乙酰甲苯-对-磺酰尿嘧啶核苷在去乙酰基时生成一个 $O_{(2)}$, 2'-环尿嘧啶核苷而变得复杂起来，因为后者經水解后产生一个經鉴定为 3-β-D-呋喃阿拉伯糖基尿嘧啶的新核苷。尿嘧啶核苷酸 *a* 就是尿嘧啶核苷-2'-磷酸

也証实了胞嘧啶核苷酸 *a* 就是胞嘧啶核苷-2′-磷酸。Baron 和 Brown[27] 在較早的时候就得到这样的結論，他們发現用肼使胞嘧啶核苷酸 *a* 和 *b* 裂解，可分別产生核糖-2- 和核糖-3-磷酸酯。在这些反应的过程中沒有发生磷酸基团的移位。

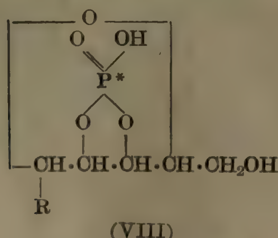
核糖核苷-5′-磷酸

象在第四章中所描述的，核糖核苷-5′-磷酸可以将核糖核酸用酶促水解制得。

这些核苷酸的結构可以比較容易地加以証明。一般都是将它們的結构直接与相应的合成核苷酸比較，或是象在証明腺嘌呤核苷-5′-磷酸（肌肉腺嘌呤核苷酸）一样，将其脫氨使生成次黄嘌呤核苷-5′-磷酸。次黄嘌呤核苷-5′-磷酸的結构已由 Levene 和 Jacobs[28] 加以証实，他們用酸水解次黄嘌呤核苷-5′-磷酸得到核糖-5-磷酸酯。再用硝酸氧化核糖-5-磷酸酯而得到核糖酸磷酸酯而不是核糖三羥基戊二酸磷酸酯。所得的核糖-5-磷酸酯也通过与合成的核糖-5-磷酸酯的比較而加以証实[29]。这些核苷酸亦可被过碘酸盐所氧化，并且在氧化时消耗 1 克分子的过碘酸盐[30]。

磷酸环酯

核苷酸的 *a* 和 *b* 异构体的发現和它們被鉴定为 -2′- 和 -3′-磷酸以及发現它們在稀酸溶液中可以迅速互相轉变的事实使 Brown 和 Todd[13] 設想这种互变是通过由-2′-或-3′-磷酸所形成的环状



(VIII)
R＝嘌呤碱或嘧啶碱

* 原文誤写为“R”，已改正为“P”（譯者注）

核苷酸(VIII)而进行的。也有人认为当核糖核酸被碱水解时,也有相应的磷酸环酯生成(参看第八章)。这些环酯是一种三酯,因为猜想在多核苷酸中相邻的核苷酸是通过5'-位置連接起来的。这些环状核苷酸曾由 Markham 和 Smith[31] 从用碱和核糖核酸酶水解核糖核酸的产物中得到証实。

Brown、Magrath 和 Todd[32] 曾合成了环状的腺嘌呤核苷酸、胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸(它們都是核苷-2',3'-氫磷酸)(VIII),并鉴定其与由核糖核酸所分离出的产物相同。嘧啶碱的环状核苷酸在核糖核酸酶[32,33] 的进一步作用下很快地变为 *b* 酸,而在酸的作用下則变为 *a* 和 *b* 两种异构体。但是,腺嘌呤核苷和鳥嘌呤核苷的磷酸环酯虽在酸中很快地被水解为 *a* 和 *b* 两种异构体,但不被核糖核酸酶所作用[33]。

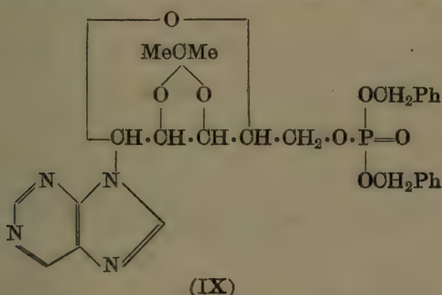
脫氧戊糖核苷酸

用酶促水解或化学方法水解脫氧核糖核酸可以制备嘧啶脫氧核糖核苷酸,但嘌呤脫氧核糖核苷酸則只能用酶促水解方法来制备。由于2'-脫氧基的存在,只能有-3'-和-5'-磷酸两种异构体。脫氧核糖核苷酸通常是用酶消化脫氧核糖核酸来制取,并且所得到的核苷酸的結构常取决于所用的酶的性质。象在第四章中所描述的,用小牛胰脫氧核糖核酸酶水解可以产生脫氧核糖核苷酸,这些核苷酸中的磷酸可以被5'-核苷酸酶除去[34],并且在离子交换柱上的行为与核苷-5'-磷酸相似[35]。因此断定这个酶产生了脫氧核苷-5'-磷酸。用小牛脾的脫氧核糖核酸酶[36]水解可以产生被用酶証明为是-3'-磷酸的脫氧核糖核苷酸[37]。用从化膿小球菌[38,39]提取出来的一种脫氧核糖核酸酶与之作用也产生了-3'-磷酸。

核糖核苷酸的合成

已經充分討論了-2'-和-3'-磷酸的合成。核糖核苷-5'-磷酸

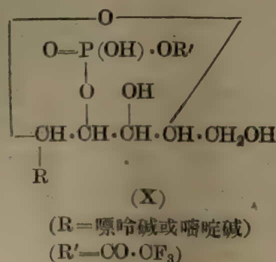
首先是由 Levene 和 Tipson[40, 41] 合成的，最近也由 Michelson 和 Todd[4] 用氧氯化磷在吡啶中将 2′, 3′-亚异丙基衍生物加以磷酸化，然后用酸水解除去亚异丙基而制得。但是所得的产物产率低，因此需要对磷酸化剂的本质加以改进。比較满意的試剂是二苄基氯磷酸[42]。2′, 3′-亚异丙基腺嘌呤核苷在吡啶中与这个試剂作用时产生 5′-二苄基磷酸(IX)；通过催化氢化除去苄基以及用酸水解除去亚异丙基后就得到腺嘌呤-5′-磷酸[43]。亦曾經用这样的方法制备[4]了胞嘧啶核苷-5′-磷酸和尿嘧啶核苷-5′-磷酸。



(IX)

磷酸环酯的合成

腺嘌呤核苷、胞嘧啶核苷和尿嘧啶核苷的磷酸环酯都是通过和三氟乙酐的作用[32] 从 a 和 b 异构体的混合物中制取的[32]。反应最可能是通过这些核苷磷酸与三氟乙酸先生成一个混合酐(X)，然后这混合酐再对邻位的羥基起磷酸化作用，虽然混合酐也有可能与另一个磷酸基团作用生成焦磷酸酯或与另一个核苷酸上的羥基作用生成二核苷酸。



(X)
(R＝嘌呤碱或嘧啶碱)
(R′—CO·CF$_3$)

脫氧核糖核苷酸的合成

Michelson 和 Todd[44] 曾合成了胸腺嘧啶核苷酸(胸腺嘧啶核苷-5′-磷酸) 和胸腺嘧啶核苷-3′-磷酸。当用二苄基氯磷酸将 5′-三苯甲基胸腺嘧啶核苷加以磷酸化，然后再使产物氫化时就生成胸腺嘧啶核苷-3′-磷酸。

将 5′-三苯甲基胸腺嘧啶核苷乙酰化使成 3′-乙酰-5′-三苯甲基胸腺嘧啶核苷，然后再和乙酸共热，卽得到 3′-乙酰胸腺嘧啶核苷。将这个核苷用二苄基氯磷酸磷酸化，然后除去保护基团卽得到胸腺嘧啶-5′-磷酸，这和天然的胸腺嘧啶核苷酸相同。也曾用相似的方法合成脫氧胞嘧啶核苷-[23]，脫氧腺嘌呤核苷- 和脫氧烏嘌呤核苷-3′- 和 -5′-磷酸[45]。在合成过程中所遇的唯一困难是熟知的嘌呤脫氧核糖核苷及其衍生物对酸的不稳定性。这就使得有必要对合成方法加以某些改进。所有合成的-5′-磷酸都和用酶促水解脫氧核糖核酸所制得的产物相同。

(郑景略　譯)

参考文献

[1] Levene, P. A. and Harris, S. A. *J. biol. Chem.* 1932, **95**, p. 755
[2] Levene, P. A. and Harris, S. A. *J. biol. Chem.* 1932, **98**, p. 9
[3] Levene, P. A. and Harris, S. A. *J. biol. Chem.* 1933, **101**, p. 419
[4] Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1949, p. 2476
[5] Gulland, J. M. and Overend, W. G. *J. chem. Soc.* 1948, p. 1380
[6] Bredereck, H. and Berger, E. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1940, **73**, p. 1124
[7] Brown, D. M., Haynes, L. J. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1950, p. 3299
[8] Gulland, J. M. and Smith, H. *J. chem. Soc.* 1947, p. 338
[9] Gulland, J. M. and Smith, H. *J. chem. Soc.* 1948, p. 1527
[10] Carter, C. E. and Cohn, W. E. *Fed. Proc.* 1949, **8**, p. 190
[11] Carter, C. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 1466
[12] Doherty, D. G. *Abstr. Pap. Amer. chem. Soc.* 118th meeting, Chicago, September, 1950, p. 56c

[13] Brown, D. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 44
[14] Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 2811
[15] Loring, H. S., Hammell, M. L., Levy, L. W. and Bortner, H. W. *J. biol. Chem.* 1952, **196**, p. 821
[16] Cavalieri, L. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 5804; 1953, **75**, p. 5269
[17] See for example, Cohn, E. J. and Edsall, J. T. *Proteins, Amino Acids and Peptides*: Reinhold, New York, 1943, p. 155
[18] Alberty, R. A., Smith, R. M. and Bock, R. M. *J. biol. Chem.* 1951, **193**, p. 425
[19] Kuna, M. quoted by Cohn, W. E. *J. cell. comp. Physiol.* 1951, **38**, Supplement 1, p. 21
[20] Neuberger, A. *Proc. Roy. Soc. A* 1937, **158**, p. 68
[21] Fox, J. J., Cavalieri, L. F. and Chang, N. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 4315
[22] Khym, J. X., Doherty, D. G., Cohn, W. E. and Volkin, E. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 1262
[23] Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1954, p. 34
[24] Brown, D. M., Fasman, G. D., Magrath, D. I. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1954, p. 1448
[25] Brown, D. M., Todd, A. R. and Varadarajan, S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 2388
[26] Brown, D. M., Fasman, G. D., Magrath, D. I., Todd, A. R., Cochran, W. and Woolfson, M. M. *Nature, Lond.* 1953, **172**, p. 1184
[27] Baron, F. and Brown, D. M. *J. chem. Soc.* 1955, p. 2855
[28] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1909, **42**, p. 335; 1911, **44**, p. 746
[29] Levene, P. A. and Stiller, E. T. *J. biol. Chem.* 1934, **104**, p. 299
[30] Paladini, A. C. and Leloir, L. F. *Biochem. J.* 1952, **51**, p. 426
[31] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 552
[32] Brown, D. M., Magrath, D. I. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 2708
[33] Brown, D. M., Dekker, C. A. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 2715
[34] Carter, C. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1537
[35] Volkin, E., Khym, J. X. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1535
[36] Koerner, J. F. and Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1957, **228**, p. 1039
[37] Koerner, J. F. and Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1957, **228**, p. 1049
[38] Cunningham, L., Catlin, B. W. and de Garilhe, M. P. *J. Amer. chem.*

Soc. 1956, **78**, p. 4642
[39] Cunningham, L. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 2546
[40] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1935, **111**, p. 313; 1937, **121**, p. 131
[41] Levene, P. A. and Tipson, R. S. *J. biol. Chem.* 1934, **106**, p. 113
[42] Atherton, F. R., Openshaw, H. T. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1945, p. 382
[43] Baddiley, J. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1947, p. 648
[44] Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1953, p. 951
[45] Hayes, D. H., Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1955, p. 808

第七章　核酸組分的酸碱性质

嘌呤碱和嘧啶碱

表 8 列出了几种嘌呤碱和嘧啶碱的 pK'_a 值。Levene、Simms 和 Bass[1, 2] 测定了尿嘧啶的解离常数，并最先得出結論，认为它具有两个酸性解离基团，其 pK'_a 值为 9.28 和 13.36。这种解离是由于具有两个 —CO—NH— 基团的緣故。随后他們[3] 对原来的工作提出了修改，并断定尿嘧啶只有一个酸性解离基团，其 pK'_a 值为 9.45。Taylor[4] 証实了这个修改和修改后的 pK'_a 值。第二个解离小的原因并非完全由于静电效应[5]，而是由于这两种基团具有差别的必然結果，虽然 1- 和 3-甲基尿嘧啶的 pK'_a 值还非常接近。这个观点被与具有 pK'_a 值为 9.42 的异胞嘧啶（2-氨基-6-氧嘧啶）的第二解离相比时的 pK'_a 值为 12.16 的胞嘧啶的极小的第二解离（—NH—CO— 基团的解离）所支持。这說明在 —NH—CO— 解离时，2-位上的羰基比 6-位上的羰基能引起更强的碱性性质。根据这个和其他类似的証据，表 8 所列的 pK'_a 值区分了 —$N_{(1)}$H—$C_{(6)}$O— 和 —$N_{(3)}$H—$C_{(2)}$O— 的解离作用。

象在胸腺嘧啶中的一样，在尿嘧啶的 5-位上引进甲基对 —NH—CO 的解离的 pK'_a 值并沒有什么影响。胞嘧啶和异胞嘧啶的 pK'_a 值分别为 4.60 和 4.01，这是因为它們含有氨基的緣故。这些解离值可与芳香族胺的解离值相比拟。这种看法已被有甲醛存在下的滴定实驗所証实[4]。

腺嘌呤和鳥嘌呤的解离的 pK'_a 值分别为 4.15 和 3.3，这可以归因于它們所含的氨基，而鳥嘌呤的另一个解离的 pK'_a 值为 9.2 則是由于含有 —NH—CO— 基团的緣故。这些解离值都可以和嘧啶的解离值相比拟。腺嘌呤的解离的 pK'_a 值为 9.8 和鳥嘌呤的解

表 8　嘌呤碱和嘧啶碱的 pK'_a 值

	氨基—$\overset{+}{N}H_3$	—$N_{(1)}H$—$C_{(6)}O$—	—$N_{(3)}H$—$C_{(2)}O$—	咪唑 —NH—
尿嘧啶		9.45[1~3]; 9.5[11]		
1-甲基尿嘧啶		9.99[3]		
3-甲基尿嘧啶		9.71[3]		
胸腺嘧啶		9.82[3]; 9.9[11]		
胞嘧啶	4.6[3,4]; 4.45[11]; 4.6[12]		12.16[3]	
5-甲基胞嘧啶	4.8[12]; 4.6[11]		12.4[11]	
异胞嘧啶	4.01[3]	9.42[3]		
腺嘌呤	4.15[6]; 4.12[13]; 4.16[14]; 4.22[16]			9.8[6,13]
鳥嘌呤	3.3[6]; 3.2[12]	9.2[6]; 9.6[12]; 9.36[15]		12.3[6]
黄嘌呤		7.7[12,17]		
1-甲基黄嘌呤			7.7[6,17]	12.05[6,17]
3-甲基黄嘌呤		8.5[17]; 8.1[6]		11.3[6,17]
7-甲基黄嘌呤		8.5[17]; 8.1[6]		
9-甲基黄嘌呤		6.3[17]; 6.25[6]		
次黄嘌呤		8.8[4]; 8.7[17]; 8.9[12,16]		12[4]

离的 pK'_a值为 12.3 几乎肯定地都是由于咪唑环中的 —NH— 解离为 —$\bar{N}$— 所致。Taylor[6] 发现苯并咪唑的碱性解离的 pK'_a 值为 5.3，而酸性解离的 pK'_a 值为 12.3。这两个解离值应当分别代表 —$\overset{+}{N}H$═ 和 —NH— 两个基团的解离。苯并咪唑解离的 pK'_a 值 5.3 可以与 Dedichen[7] 所測得的咪唑解离的 pK'_a 值 7.1 相比拟，而苯并咪唑的解离的 pK'_a 值 12.3 是与鳥嘌呤、1- 和 3-甲基黄嘌呤以及次黄嘌呤的最弱的解离属于同一級次。正如所料，7- 和 9-甲基黄嘌呤沒有相应的解离。腺嘌呤的这个 9.8 的解离值在与上述可資比較的分子中所含的相应基团的解离值相比时显得特别低。Taylor[8] 将腺嘌呤中的这个基团所具有的异乎寻常的酸性强度归因于在嘧啶环中氮原子上具有阴电荷与咪唑环中氮原子上具有阳电荷的分子結构共振的結果。如所观察到的一样，咪唑环中氮原子上的阳电荷傾向于增强这个基团的酸性强度。Taylor

认为这个解釋可被腺嘌呤的 $C_{(4)}—C_{(5)}$ 鍵长比胞嘧啶的 $C_{(4)}—C_{(5)}$ 鍵长为长的事实所支持，象 Broomhead[9]（参看第五章，103 頁）用結晶学方法所作的測定所証实的。但是，Cochran[10] 认为 Taylor 所观察到的共振結构也能使 $C_{(9)}—C_{(8)}$ 和 $N_{(7)}—C_{(5)}$ 鍵变为单鍵，$N_{(7)}-C_{(8)}$ 鍵变为双鍵，而結晶学上的数据則指出所有这些鍵全都相似，并且都带有 20～50% 的双鍵性质。

核苷和核苷酸

表 9 列出了核苷和核苷酸的 pK'_a 值。核苷的 pK'_a 值与它們的母体嘌呤碱和嘧啶碱的 pK'_a 值相接近，虽然这些母体的 pK'_a 值都有偏低的趋势，也就是說，酸性解离是加强了。在大多数的情况下，还可以看出凡 pK'_a 值在 12.3～12.5 之間的，常伴随着一个額外的解离現象，这个解离值是属于糖的羥基解离的正确級次。D-核糖的解离值还沒有測定过，但是已經知道葡萄糖的 pK'_a 值是 12.1[18～20]。

比較核苷酸与其相应的核苷的解离值时表明它們比后者多了两个解离基团，它們的 pK'_a 值为 0.7～1.6 和 5.9～6.5，这两个数值是糖磷酸酯的第一和第二解离的正确級次。葡萄糖-3-磷酸酯的第一和第二解离数值为 0.84 和 5.67[21]。其他糖磷酸酯的解离值經測定也都相似[14, 22]。

因为腺嘌呤核苷酸、鳥嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸都是含有阳离子氨基和阴离子磷酸基的两性电解质；因此有可能以双极离子作为主要的形式存在。計算[5] 証明腺嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸在水溶液中时几乎完全成为双极离子，而鳥嘌呤核苷酸在水溶液中时，双极离子与不带电分子的比例仅为 7:1，这是因为质子化的氨基具有强酸性质的緣故。但是卽使如此，在等电点时双极离子仍占很大部分。

过去所記載的解离常数值都是 2′-和 3′-磷酸酯混合物的解离常数值。但是，自从能够从每一种核苷酸中分离出其中的各个异

表 9 核苷和核苷酸的 pK'_{α} 值

	磷酸的一級解离	氨基	磷酸的二級解离	$—N_{(1)}H—C_{(6)}O—$	糖羥基
腺嘌呤核苷	—	3.45[1,2]; 3.63[13]; 3.4[24]	—	—	12.5[1,2]
腺嘌呤核苷-2′-磷酸	0.89†	3.80[13]; 3.79[14]	6.15[13]; 6.21[14]	—	*
腺嘌呤核苷-3′-磷酸	0.89†	3.65[13]; 3.56[14]; 3.70[1,2,25]	5.88[13]; 6.06[14]; 6.01†[1,2]	—	*
腺嘌呤核苷-5′-磷酸	*	3.74[13]; 3.89[14]; 3.8[26]	6.05[13]; 6.48[14]; 6.2[26]	—	*
脫氧腺嘌呤核苷-5′-磷酸	*	4.4[27]	6.4[27]	—	*
鳥嘌呤核苷	—	1.6[1,2]	—	9.2[1,2]	12.3[1,2]
鳥嘌呤核苷酸†	0.7†	2.3†[1,2]; 2.49†[25]	5.92†[1,2]; 6.05†[25]	9.38†[1,2]; 9.33†[25]	*
脫氧鳥嘌呤核苷-5′-磷酸	*	2.9[27]	6.4[27]	9.7[27]	*
胞嘧啶核苷	—	4.11[28]; 4.15[12]; 4.22[1,2]	—	12.16‡[1,3]	12.3[1,2]
胞嘧啶核苷-2′-磷酸	0.8†	4.30[12,28,29]; 4.36[24]	6.2[29]	—	*
胞嘧啶核苷-3′-磷酸	0.8†	4.30[29]; 4.28[12,24]; 4.24†[1,2]; 4.22†[25]	6.0[29]; 5.97[1,2]; 6.07†[25]	—	*
胞嘧啶核苷-5′-磷酸	*	4.44[28]	*	—	*
脫氧胞嘧啶核苷-5′-磷酸	*	4.45[12]; 4.6[27]	6.6[27]	—	*
5-甲基胞嘧啶核苷酸	*	4.4[12]	*	—	*
尿嘧啶核苷	—	—	—	9.17[1,2]; 9.30[25]	12.5[1,2]
尿嘧啶核苷酸†	1.02†[1,2]	—	5.88†[1,2]	9.43†[1,2]	*
胸腺嘧啶核苷酸	1.6[27]	—	6.5[27]	10.0[27]	*

* 未測定; † a 及 b 异构体的混合物; ‡ $—N_{(3)}H—C_{(2)}O—$

构体后，就有可能单独测定个别异构体的 pK_a' 值。

显然，从表 9 所列数值可以看出引进磷酸基团时可使氨基和—NH—CO— 基团的酸性解离降低。这当然是一种相互影响，以致核苷酸中磷酸基团的二級解离与在磷酸中的二級解离相比时是加强了(这对一級解离也是一样，但是不能很准确地测定出来)。这个观察和場效应相一致[23]，而且是荷电基团之間距离的函数，距离愈小，pK_a' 值的变更愈大。这种效应曾被 Cavalieri[24] 引用作为制定核苷酸 *a* 和 *b* 两种异构体构型的根据，这在第六章中已經充分討論过。

(郑景略 譯)

参考文献

[1] Levene, P. A. and Simms, H. S. *J. biol. Chem*. 1925, **65**, pp. 519, 527
[2] Levene, P. A., Simms, H. S. and Bass, L. W. *J. biol. Chem*. 1926, **70**, p. 243
[3] Levene, P. A., Bass, L. W. and Simms, H. S. *J. biol. Chem*. 1926, **70**, p. 229
[4] Taylor, H. F. W. *Thesis*, University of London, 1946
[5] Jordan, D. O. *Progr. Biophys*. 1951, **2**, p. 51
[6] Taylor, H. F. W. *J. chem. Soc*. 1948, p. 765
[7] Dedichen, G. *Ber. dtsch. chem. Ges*. 1906, **39**, p. 1831
[8] Taylor, H. F. W. *Nature, Lond*. 1949, **164**, p. 750
[9] Broomhead, J. M. *Acta Cryst*. 1948, **1**, p. 324; 1951, **4**, p. 92
[10] Cochran, W. *Acta Cryst*. 1951, **4**, p. 81
[11] Shugar, D. and Fox, J. J. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **9**, p. 199
[12] Cohn, W. E.—unpublished observations given in Cohn, W. E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 227
[13] Alberty, R. A., Smith, R. M. and Bock, R. M. *J. biol. Chem*. 1951, **193**, p. 425
[14] Kuna, M., *quoted by* Cohn, W. E. *J. cell. comp. Physiol*. 1951, **38**, Supplement 1, p. 21
[15] Cavalieri, L. F., Kerr, S. E. and Angelos, A. *J. Amer. chem. Soc*. 1951, **73**, p. 2567

[16] Albert, A. *Biochem. J.* 1953, **54**, p. 646
[17] Ogston, A. G. *J. chem. Soc.* 1936, p. 1376
[18] Hirsch, P. and Schlags, R. *Z. phys. Chem.* 1929, **141**, p. 387
[19] Urban, F. and Shaffer, P. A. *J. biol. Chem.* 1931, **94**, p. 697
[20] Urban, F. and Williams, R. D. *J. biol. Chem.* 1933, **100**, p. 237
[21] Meyerhof, O. and Lohmann, K. *Biochem. Z.* 1927, **185**, p. 113
[22] Kumler, W. D. and Eiler, J. J. *J. Amer. chem. Soc.* 1943, **65**, p. 2355
[23] Cohn, E. J. and Edsall, J. T. *Proteins, Amino Acids and Peptides*: Reinhold, New York, 1943, p. 155
[24] Cavalieri, L. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 5804; 1953, **75**, p. 5268
[25] Fletcher, W. E. *Thesis*, University of London, 1948
[26] Wassermeyer, H. *Hoppe-Seyl. Z.* 1928, **179**, p. 238
[27] Hurst, R. O., Marko, A. M. and Butler, G. C. *J. biol. Chem.* 1953, **204**, p. 842
[28] Fox, J. J., Cavalieri, L. F. and Chang, N. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 4315
[29] Loring, H. S., Bortner, H. W., Levy, L. W. and Hammell, M. L. *J. biol. Chem.* 1952, **196**, p. 807

第八章　核酸的結构(一)
核苷酸間鍵的性质

引　言

現在旣已明确了核苷酸中所有的主要結构特征，因此就有可能来考虑核酸的結构。从核酸分子量的測定(将在第十章和第十二章中討論)，現在已經认識到所有核酸都是大分子，其分子量从可能只有几万一直到好几百万，因此它們都是多核苷酸。要确定这些多核苷酸的結构，首先需要考虑的問題是在多核苷酸分子中使两个相邻的核苷酸連結在一起的初級鍵的性质和位置。

戊糖核酸中核苷酸間的鍵

在使許多核苷酸連結成一个多核苷酸时，理論上可能有几种类型的鍵。值得仔細考虑的是：(1) 磷酸和糖羥基之間的酯鍵，(2) 两个磷酸基团之間的焦磷酸鍵，(3) 在嘌呤环和嘧啶环上的氨基和磷酸基之間的磷酰胺鍵和 (4) 两个碳水化合物殘基之間的醚鍵。很早就知道用酸或用碱滴定核酸可以从这些可能性中作出判别。因此对核酸的酸碱基团的电位滴定就成为研究它們結构的一个重要方法。其他如与染料結合等方法也曾应用以研究其中的酸性和碱性基团的数目和性质。核酸电位滴定的詳細內容将在第九章和第十章中叙述。本章只要論述这些研究的結果就已經足够了。

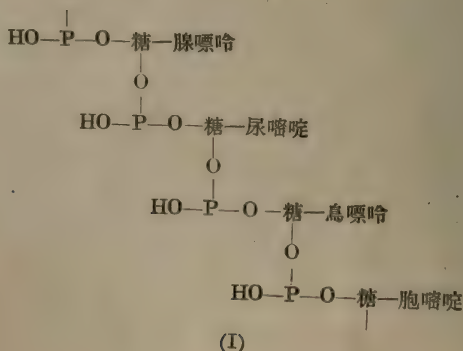
如果将上述四种构成核苷酸之間的鍵的可能方式分别用于构成核酸，其結果将产生具有极不相同类型的和不同数目的可滴定的游离酸性基团和碱性基团的大分子。这些基团摘录在表 10 中。假如在核酸中只有一种方式的鍵占优势，則用电位滴定法来測定

核酸中游离酸-碱基团的数目和性质将能对这些可能性作出区别。

表 10 具有不同連結方式的多核苷酸中的可滴定基团

鍵的形式	多核苷酸中游离的酸性基团和碱性基团			
	一級≡POH基团	二級≡POH基团	氨 基	—NH—CO—
(1) 糖-磷酸酯鍵	全 有	沒 有	全 有	全 有
(2) 焦磷酸鍵	沒 有	沒 有	全 有	全 有
(3) 磷酸酰胺鍵	全 有	沒 有	沒 有	全 有
(4) 醚鍵	全 有	全 有	全 有	全 有

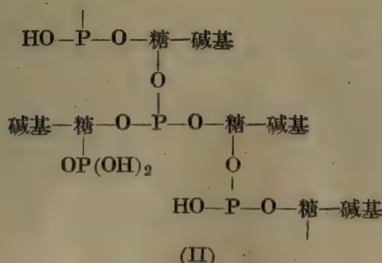
Levene 和 Simms[1] 与 Jorpes[2] 和 Makino[3]最早进行了这些研究，以后 Bredereck 及其同工作者[4,5]也得到了相似的結果。所得到的滴定曲綫都証明当滴定到 pH 8.0 时，相当于每 4 个磷原子就有 3 到 4 个可以电离的基团(滴定結果通常都是这样記录的，其理由是因为在原始的概念中认为在所有核酸中这四种核苷酸都完全以等分子的比例存在)。Levene 和 Simms 认为这些基团就是腺嘌呤核苷酸、鳥嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸中的三个氨基(参看第七章，表 9)和一个一級电离的磷酸基团。因为等电点約在 pH 1，所以认为还有 3 个一級磷酸基团。在这样証据的基础上(参看表10)显然可以排除(2)、(3)和(4)的假設，而磷酸酯鍵就成为唯一的可能了。因此 Levene 和 Simms[6] 对核糖核酸提出了如下的結构式(I)：



(I)

Allen 和 Eiler[7] 用精密的技术对酵母核糖核酸进行了更細致的电位滴定研究，他們首先观察到滴定曲綫表示相当于每 4 个磷原子就存在着 3 个氨基和一个在 pH5.0～7.5 范圍內被滴定的基团。Allen 和 Eiler 认为这个最后的基团是一个一級磷酸基，它的解离曾受到大分子中的其他酸性解离作用的电离影响而大大地被減弱了。

Fletcher、Gulland 和 Jordan[8] 得到了与 Allen 和 Eiler 极其相似的滴定結果，但是他們对所得的結果所作的解釋是：每有 4 个磷原子就表示有 3 个氨基、1 个二級磷酸基、2 个 —NH—CO— 的解离和 3 个一級磷酸基团的解离。这个結論已被脫氨的核糖核酸的滴定所証实，在这个实驗中有可能直接滴定一級磷酸的解离。其他几个工作者[9~15] 也都証实了滴定曲綫的形状，他們一般都对所得的結果作了相似的解釋，虽然在滴定中曾发現若所用核酸的样品不同，則磷酸二級解离的程度亦随之不同。在核酸中只存在有 3 个一級磷酸的解离和 1 个二級磷酸的解离使 Fletcher、Gulland 和 Jordan[8] 认为这是表示相当于每 4 个磷原子就有将近 1 个三酯化的磷酸基存在，因此提出了一个带支鏈的結构式 (II) 以代替 Levene 和 Simms 所設想的綫型聚合物 (I)。但是这些結果仍表示核苷酸間的鍵是一个磷酸酯鍵。滴定研究的結果和所作的解釋已經在一定程度上为 Cavalieri 及其同工者[15, 16] 的核酸与染料結合的研究和核糖核酸被碱水解的动力学的研究所証实[17]。



(II)

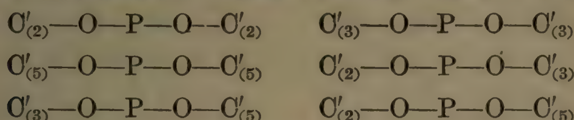
在上述的大多数研究中都是对核糖核酸的降解样品进行的。Fletcher、Gulland 和 Jordan[8] 所用的样品事实上几乎肯定是从

酵母用碱提取出来的一个商品。因此对一个更小心制备而降解較少的样品的滴定就显得格外重要。在最近的研究中，Crestfield、Smith 和 Allen[18] 发現，在采用防止降解方法制得的酵母核糖核酸的样品中，相当于每16个磷原子只有一个二級磷酸基。Peacoke 及其同工者[19, 20] 从 *Aerobacter aerogenes* 和酵母中小心制得的核糖核酸样品的观察也得到类似的結果。根据滴定的研究，可以断定在这些核酸中幷不含有可以檢出的二級磷酸基。所以似乎很可能 Fletcher、Gulland 和 Jordan[8] 所观察到的三酯基团是一种在制备过程中由核酸降解所产生的矯作物。

最近 Brown、Magrath 和 Todd[21] 从尿嘧啶核苷-3′-磷酸的二烴基酯的水解研究中得到有力的証据支持了核糖核酸中沒有任何磷酸三酯基团的說法。用重氮甲烷或苯基重氮甲烷使尿嘧啶核苷-3′-磷酸烴基化便生成尿嘧啶核苷-3′-磷酸的二甲酯或二苄酯，它們当然都是磷酸三酯。他們发現这些合成的三酯都是极不稳定的物质。檢查二甲酯在 37°C 下和 pH 0～9 的范圍內的稳定性时証明，在这个整个 pH 范圍內这个二甲酯被水解为一甲酯，同时有少量的环状磷酸酯生成。二甲酯的半反应期在 pH 0 和 pH 9 时約为 15 分钟，而在 pH 7 时則为 75 分钟。这些磷酸三酯在卽使是温和的水解条件下的极不稳定性是与在同一条件下的核糖核酸的稳定性相比較的。在維持 pH 在 10.6 下的核糖核酸溶液中看不出有任何酸性基团释放出来[22, 23]，而在这些条件下，尿嘧啶核苷磷酸二烴基酯却立卽水解。如果认为在核糖核酸中仍有磷酸三酯基团存在的可能性，則必須对这种三酯在多核苷酸中的明显的稳定性和在单核苷酸中的显著的不稳定性的对照予以說明。因为和单核苷酸体系相比，在核糖核酸中的磷酸二酯鍵沒有被发現有任何异常的水解，因此 Brown、Magrath 和 Todd[21] 认为沒有理由假設任何磷酸三酯基团会表現出异乎寻常的性质。現在的証据有力地支持了 Levene 和 Simms[6] 所首先提出的簡单綫型分子的模型(I)。

已經断定核糖核酸中核苷酸間的鍵是由两个相邻的核苷酸中

糖的羥基所形成的一种磷酸二酯鍵，因此現在所需要测定的是哪一个羥基与成鍵有关。这有以下几种可能：在每一个核苷殘基的 $C'_{(2)}$、$C'_{(3)}$ 和 $C'_{(5)}$ 的羥基都可以参加核苷酸間鍵的形成。因此理論上有六种可能結合的鍵。它們可用下列图解来表示(在图解中只标出在磷原子上与成鍵有关的氧原子，其余的氧原子一概省略)：



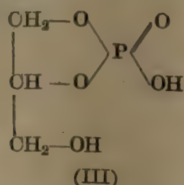
$C'_{(2)}—O—P—O—C'_{(2)}$　　$C'_{(3)}—O—P—O—C'_{(3)}$

$C'_{(5)}—O—P—O—C'_{(5)}$　　$C'_{(2)}—O—P—O—C'_{(3)}$

$C'_{(3)}—O—P—O—C'_{(5)}$　　$C'_{(2)}—O—P—O—C'_{(5)}$

显然，其中有几种在多核苷酸中不可能是唯一的連接形式。因此，一个 $C'_{(2)}—O—P—O—C'_{(2)}$ 鍵就必須和其他某种不含有 $C'_{(2)}$ 位置的鍵相交替。

在核糖核酸的碱水解产物的研究中找到了排除上述可能性中的某几种可能性的方法。象在第六章中所叙述的，核糖核酸用碱水解后都会产生所有各种核苷酸的 2′-和 3′-异构体的混合物。Brown 和 Todd[24] 注意到核苷酸异构体和甘油磷酸酯两者之間性质的共同点。在酸性条件下，2′- 和 3′-异构体間可以很快地互相轉变，每一种純的异构体可以轉变为含有两种异构体的混合物。但是相反的，在碱性条件下，异构体則是稳定的。甘油磷酸酯亦具同样的性质。甘油 α-磷酸酯虽然不受碱的影响，但在温热的稀酸溶液中則将重行排列，生成 α- 和 β-磷酸酯的平衡混合物。Chargaff[25]指出这是分子內的重排列，并且认为[25, 26] 磷酸基团是通过生成环酯(III)而产生移位。更进一步来說 α-甘油磷酸酯对碱虽然稳定，但甲基-α-甘油磷酸酯在碱性条件下則很容易被水解生成甲醇和一种 α-甘油磷酸酯与 β-甘油磷酸酯的混合物。这对不产生磷酸甲酯的論点具有重要的意义[27]。Brown 和 Todd[24]断定磷酸二



(III)

酯之是否容易被碱水解的先决条件是必須有一个羥基存在，其位置应与磷酸基紧邻。水解的机制包括生成一个中性的环状磷酸三酯。Kumler 和 Eiler[28] 已經指出，在相邻的羥基和磷酸基之間起着相互作用，并說明若与单烴基磷酸酯相比时，糖磷酸酯应当是异乎寻常的强酸。Fonó[29] 在此以前也曾强調过，邻近的羥基会使含有甘油或乙二醇殘基的磷酸二酯变为不稳定的重要性，并且也认为在水解过程中有可能生成一种环三酯的中間产物。Fonó 并且将这些見解应用到核酸水解的机制中，认为和脱氧戊糖核酸对碱的稳定性相比时，核糖核酸对碱的不稳定性应归因于前者在 $C'_{(2)}$ 上有一个羥基存在。

Brown 和 Todd[24] 研究了腺嘌呤核苷苄基氫磷酸的水解行为后証实了这些見解。腺嘌呤核苷-2′-和-3′-苄基氫磷酸两者都含有一个与磷酸基相邻的羥基，这两种异构体在 30°C 时很容易被弱碱水解。但是，在相同的条件下，不含有一个与磷酸基相邻的羥基的腺嘌呤核苷-5′-苄基氫磷酸則不被碱水解。Brown、Magrath 和 Todd[30] 的环酯的合成以及 Markham 和 Smith[31] 对于在核糖核酸水解产物中磷酸环酯的存在的証明均对这个見解提供了更有力的証据。

因此有强有力的証据說明核糖核酸水解的第一阶段是生成一个环三酯。象前面所讲的，磷酸三酯极不稳定[21]，在酸性和碱性介质中都立即被水解，因此在核糖核酸的水解过程中所生成的中間产物三酯亦将立即被水解。虽然在这个环状中間产物中的三个酯鍵的反应能力均相仿，但分子的降解只有在連接着单独取代基的鍵断裂时才能发生。这种反应机制可以用 (IV)～(VII) 的图解来表示，其中糖的部分簡写为 $C'_{(2)}—C'_{(3)}—C'_{(5)}$。虽然这个反应机制原先是为着要理解包括中性三酯 (V) 在內而考虑的，但是現在认为水解反应是决定于能被氫离子或氫氧离子所催化的邻近羥基对 P=O 鍵的攻击，同时 R 以烴氧基离子的形式被除去。因此反应进行的次序可用 (VIII)～(X) 表示[32]。酶促水解大概也是按照相似的机制进行的。

$C'_{(2)}$—OH, $C'_{(3)}$—O, —$C'_{(5)}$; O=P(OH)(O—R) → $C'_{(2)}$—O, $C'_{(3)}$—O, —$C'_{(5)}$; P(=O)(O—R)

(IV) (V)

$C'_{(2)}$—O, $C'_{(3)}$—O, —$C'_{(5)}$; P(=O)(OH) + ROH

$C'_{(2)}$—OH, $C'_{(3)}$—O—P(OH)$_2$(=O), —$C'_{(5)}$

(VI)

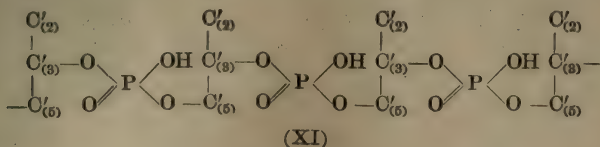
$C'_{(2)}$—O—P(OH)$_2$(=O), $C'_{(3)}$—OH, —$C'_{(5)}$

(VII)

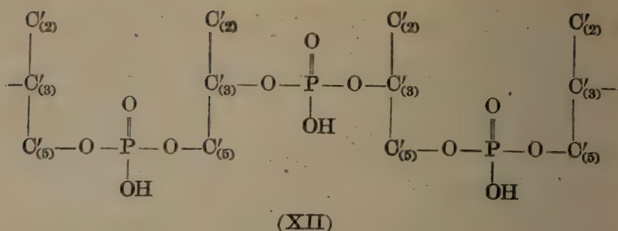
$C'_{(2)}$—OH, $C'_{(3)}$—O—P(=O)(O^-)(OR) → $C'_{(2)}$—O, $C'_{(3)}$—O; P(O^-)(=O) → $C'_{(2)}$—OH, $C'_{(3)}$—O · P(=O)(OH)$_2$

(VIII) (IX) (X)

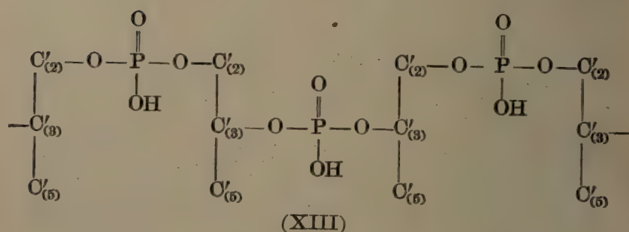
弄清核糖核酸的碱性水解机制并不就能完全确定核苷酸間鍵的位置；但是可以排除几种可能的結合。制定上述机制时明显地指出它涉及 2′- 或 3′-的位置，或者这两个位置都涉及。因此核苷酸間鍵的結构可以写成如 (XI) ~ (XIV)。其他几种核苷酸間鍵的結构也可以在式(XI)和(XII)中用 $C'_{(2)}$ 代替 $C'_{(3)}$ 来写出。



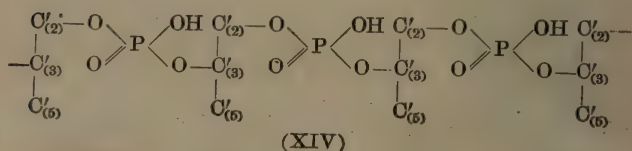
(XI)



(XII)



(XIII)



(XIV)

根据水解的性质及其产物,可以排除其中的几种可能結构[33]。在結构(XII)以及其他含有 $C'_{(2)}$ 位置的相应結构中都含有 $C'_{(5)}$—$C'_{(5)}$ 鍵,因而都可以排除,因为在水解时它們都会产生能抵抗更进一步水解的二核苷酸。$C'_{(5)}$—O—P—O—$C'_{(5)}$ 对水解是稳定的这个見解是根据上述的[24]腺嘌呤核苷-5′-苄基氫磷酸对碱水解的稳定性而来的,并且从合成的二核苷-5′,5′-磷酸对碱的稳定性而得到証实。在能使核糖核酸完全水解成单核苷酸的条件下,二尿嘧啶核苷-5′,5′-磷酸[34](由 Gulland 和 Smith 所合成,当时誤认为-2′,2′-异构体)和腺嘌呤核苷-5′-尿嘧啶核苷-5′-磷酸[35]两者对碱都是稳定的。这个稳定性是因为缺乏一个环合成三酯所需的,以及随后容易裂解为单核苷酸所需要的邻近羥基的緣故。

結构(XIII)和(XIV)也可以排除去,因为他們并不含有-5′-磷酸。Cohn 和 Volkin[36,37] 曾从磷酸单酯酶的活性被抑制的蛇

毒磷酸二酯酶对核糖核酸作用所产生的水解产物中分离出所有的四种 5′-核苷酸(参看第四章)。

因此根据实驗証据的揭露,只有結构(XI)才是可以接受的結构,并且核糖核酸中核苷酸間的鍵是一个磷酸酯鍵,将一个核苷酸中的 $C'_{(2)}$ 或 $C'_{(3)}$ 位置和相邻的核苷酸中的 $C'_{(5)}$ 位置連接起来。

要决定 $C'_{(2)}$ 和 $C'_{(3)}$ 的位置是困难的，因为碱性水解的进行要通过环状核苷-2′,3′-磷酸，并且不論在原来核糖核酸中的核苷酸間的鍵是 2′-5′ 或 3′-5′, 都将得到同一种核苷-2′- 和 -3′-磷酸的混合物。但是,研究核酸酶类型的酶作用时可以解决这个問題。胰核糖核酸酶对核糖核酸作用的机制被认为是和用碱水解时中間經过环状磷酸酯的机制相似[24, 31, 38, 39]。Brown 和 Todd[32]曾对核糖核酸酶对尿嘧啶核苷-2′-和-3′-苄基氫磷酸和胞嘧啶核苷-2′-和-3′-苄基氫磷酸的作用进行了研究，而 Brown、Heppel 和 Hilmoe[40]則研究了从脾、腸粘膜、毒麦草和馬鈴薯中获得的具有和核糖核酸酶同样性质的含酶組分对腺嘌呤核苷-2′- 和 -3′-苄基氫磷酸和胞嘧啶核苷-2′- 和 -3′-苄基氫磷酸的作用。所有的酶一样都能够水解所有的 -3′-苄基氫磷酸使其变为相应的核苷-3′-磷酸，但对 2′-异构体則沒有作用。因此这似乎是这些酶都起着二酯酶的作用，专門水解核苷-3′-磷酸的酯。

这个証据的重要性在于这些酶对核糖核酸的作用。核糖核酸酶不能使核糖核酸完全水解为核苷酸，因为这个酶显然对于某种核苷酸間的鍵是特异的，并且水解所得的产物是嘧啶核苷酸和寡核苷酸(参看第四章)。但是 Brown、Heppel 和 Hilmoe[40] 所制得的脾的酶組分对核糖核酸水解的催化几乎达到完全,使 90% 以上的原来的核糖核酸变为单核苷酸。由于这些酶已被証实对連在糖部分 3′- 位上的二酯是特异的,因此不論酶促水解的机制如何,核糖核酸中鍵的連接点就必須是在核苷殘基的 3′-位上。因为已經証明核苷酸間的結合牽涉到 5′-位,因此核糖核酸中核苷酸間的鍵是一种由一个核苷酸的 $C'_{(3)}$- 位与其相邻的核苷酸的 $C'_{(5)}$- 位相連接的磷酸二酯鍵。

如果在酶促水解过程中有环状核苷酸中間产物生成，则上述的結論就不能十分肯定。但是，Heppel、Whitfield 和 Markham[42] 曾証明脾脏的酶制剂虽然也能使核苷-2′, 3′-磷酸水解，但在水解时只产生核苷-2′-磷酸。这就說明并沒有生成环状的中間产物，并且在酶促水解过程中磷酸基移位的可能性很小。核糖核酸酶对核糖核酸的徹底作用而产生的二核苷酸的降解也进一步地支持了上述的观点。这些二核苷酸是由一个嘌呤核苷在 $C'_{(2)}$ 或 $C'_{(3)}$ 位上和一个嘧啶核苷酸的 $C'_{(5)}$ 位上通过磷酸二酯鍵連接而組成的。如果用前列腺的磷酸单酯酶使二核苷酸脫去一个磷酸而成二核苷单磷酸，然后再用过碘酸鈉处理，则带有游离的 $C'_{(2)}$ 和 $C'_{(3)}$(即在 $C'_{(5)}$ 位上与磷酸二酯基团相連的) 基团的殘基就会被氧化为二醛。經純化后的产物在 pH 10 时用 Russell 蝮蛇毒液处理，则生成一个胞嘧啶的衍生物和一个被认为是核苷-3′-磷酸的核苷酸。因此这就說明了在原来的二核苷酸中和 $C'_{(5)}$ 相連的連接点是 $C'_{(3)}$ 而不是 $C'_{(2)}$。

最近 Michelson，Szabo 和 Todd[43] 曾用 3′,5′-二乙酰腺嘌呤核苷-2′-苄基氯磷酸 (3′,5′-diacetyladenosine-2′-benzylphosphorochloridate) 与 2′,3′-二乙酰尿嘧啶核苷縮合，然后除去保护基而合成了二核苷酸——腺嘌呤核苷-2′-尿嘧啶核苷-5′-磷酸。这个二核苷酸不能被胰核糖核酸酶或从脾脏中得到的含酶組分所水解，因此証实了这些酶对 $C'_{(3)}$ 位的特异作用。不幸的是，对上述論証更有关系的相应的 3′,5′-二核苷酸尚沒有合成出来。

脫氧戊糖核酸中核苷酸間的鍵

脫氧戊糖核酸中核苷酸間鍵的問題比戊糖核酸中核苷酸間鍵的問題为簡单，因为由于脫氧戊糖核酸含有 2′-脫氧基使任何产生 $C'_{(2)}$ 和 $C'_{(3)}$ 磷酸酯异构現象的可能性不能存在。用作測定这些酸中核苷酸間鍵的性质的方法和上述用于測定戊糖核酸中核苷酸間鍵的性质的方法非常相似。

脫氧戊糖核酸的最早的滴定研究产生了矛盾的結果[1,3,44~48]。滴定酸到 pH 8.0 时所得的結果被解釋为相当于每 4 个磷原子含有 4 到 5 个酸的解离。这些結果差不多可以断言是由于在几乎肯定是降解的样品中含有高比例的二級磷酸基团的緣故。

Harmmarsten[49] 首先对用温和方法分离所得的酸进行了研究，他用电导滴定法观察到在这个 pH 范圍內的滴定中每 4 个磷原子只有 4 个酸的解离，完全沒有什么二級磷酸的解离。这个結果被 Jorpes[2] 及 Stenhagen 和 Teorell[50] 的初步滴定研究所証实。

Gulland、Jordan 和 Taylor[51] 对小心制备的高分子量的小牛胸腺脫氧戊糖核酸样品所作的更广泛的研究指出，从可逆的逆向滴定曲綫中可以看出每 4 个磷原子就有 0.3 或更低当量数的二級磷酸解离。这个观察以后也被 Signer 和 Schwander[52] 与 Cosgrove 和 Jordan[53] 以及 Lee 和 Peacocke[54] 所証实。但是，二級电离的磷酸解离滴定曲綫的精确分析需要知道准确的 pK_a' 值和其他解离基团的准确数量。在上述計算方法中均假定核苷酸是以等分子的比例存在的。但是自从采用了色层分析方法后，发现这个假定对于大多数核酸是十分錯誤的，因此就采用了适当的分析值来分析滴定曲綫。Lee 和 Peacocke[54] 所計算的二級电离的磷酸基团的比例为每 4 个磷原子相当于 0.2~0.4 当量。Cosgrove 和 Jordan[55] 与 Jordan、Mathieson 和 Matty[56] 也得到相似的結論。

但是由于色层分析方法不够准确，碱基回收率低，而且所用的 pK_a' 值是核苷酸的 pK_a' 值而不是多核苷酸中相应基团的 pK_a' 值，因此这个結果仍是可以怀疑的。Cox 和 Peacocke[57] 用从不同的多核苷酸中所得的酸-碱基团的更准确的分析数据和 pK_a' 值对从鲱魚精子中所取得的一种高聚合的脫氧戊糖核酸的样品作了进一步的研究。他們用这个方法也构成了一个理論的解离曲綫，它和实驗的曲綫十分符合，而且不含有二級磷酸的解离。由此得出結論：如果脫氧戊糖核酸中含有支鏈或主鏈的其他形式的間断，則这种情形一定只以极低的頻率出現，即 30 个核苷酸中还不到一

个[58]，以致不能用电位滴定法检出。

显然脱氧戊糖核酸中核苷酸間的連接和戊糖核酸中核苷酸間的連接一样，是由一个核苷酸中的 $C'_{(3)}$ 原子和相邻的核苷酸中的 $C'_{(5)}$ 原子相連的磷酸二酯鍵。因此多核苷酸就具有和上述戊糖核酸相似的結构(I)(142 頁)。

此外还曾經提出过其他类型的鍵。为了説明当用碱在pH 11.5下处理脱氧戊糖核酸时所观察到的和碱基相結合的基团的释出，von Euler 和 Fonó[59] 提出了在磷酸酯和 —NH—CO— 基团之間存在着一定的鍵。Little 和 Butler[60] 亦提出过相似的建議，說明在脱氧核糖核酸酶的作用下釋出具有 pK'_a 9～10 的基团。但是这些現象最好用 Gulland、Jordan 和 Taylor[51] 所提出的核苷酸間的氫鍵来解釋。Stacey 及其同工者[61, 62] 与 Lee 和 Peacoke[63] 根据用酸或碱温和处理后的脱氧戊糖核酸对 Feulgen 試剂的反应，曾假設在脱氧核糖殘基 $C_{(1)}$ 上有少数不稳定的磷酰鍵存在。但是，不管是否有这样的鍵(其証据并不健全)存在，毫无疑問，在两个糖殘基之間的主要的鍵是磷酸二酯鍵。

从酶作用和化学作用的研究可以得到更进一步的証据以支持 $C'_{(3)}$—$C'_{(5)}$ 間磷酸二酯鍵的存在。Carter[64] 根据脱氧核糖核苷酸与 5′-核苷酸酶所发生的作用以及 Volkin、Khym 和 Cohn[65] 根据它們的层析行为与腺嘌呤核苷-5′-磷酸的相似都証明用小牛胰的脱氧核糖核酸酶水解脱氧核糖核酸所得到的近乎理論产量的脱氧核糖核苷酸为-5′-磷酸。这个証据証实了核苷酸間的鍵的一端是連在 $C'_{(5)}$ 原子上。Koerner 和 Sinsheimer[67] 証明用小牛脾的脱氧核糖核酸酶作用所得的脱氧核糖核苷酸[66]是 -3′-磷酸；用从化膿小球菌所得的脱氧核糖核酸酶作用也产生-3′-磷酸[68, 69]。因此鍵的形成亦牵涉到 $C'_{(3)}$ 原子。除了 $C'_{(3)}$—$C'_{(5)}$ 鍵外，其他可能的結构只有交替的 $C'_{(3)}$—$C'_{(3)}$ 和 $C'_{(5)}$—$C'_{(5)}$ 鍵 (XII) (148頁)，这在先前也认为是一种可能的戊糖核酸結构，但是它在酶促水解中所产生的不可能都是近乎理論产量的 5′-磷酸形式的脱氧戊糖核苷酸。

Michelson 和 Todd[70] 所合成的二胸腺嘧啶核苷二核苷酸对酶的反应进一步証实了核苷酸間的鍵为 $C'_{(3)}—C'_{(5)}$。这个二核苷酸是由 3′-乙酰胸腺嘧啶核苷与胸腺嘧啶核苷-3′-苄基氯磷酸-5′-(双苄基磷酸) 縮合后再除去保护基而制成的 (这是在偶然的情况下首次用化学方法完成的二核苷酸的合成)。这样的二核苷酸曾經从脫氧核糖核酸酶消化脫氧核糖核酸的产物中分出，但实质上并沒有完全分离。Markham 和 Smith[71] 以及 Sinsheimer[72] 研究了它們对酶的作用。合成的二核苷酸对純化的响尾蛇毒液磷酸二酯酶的反应和用酶消化脫氧核糖核酸所得的二核苷酸对这个酶的反应相同。因为在合成的二核苷酸中的鍵肯定是 $C'_{(3)}—C'_{(5)}$，因此在天然二核苷酸中也应当有这种构型。从鯡魚精子的脫氧戊糖核酸的酸水解产物中分离出来的胸腺嘧啶核苷-3′,5′-二磷酸和脫氧胞嘧啶核苷-3′,5′-二磷酸[73]也証实是这种形式的鍵。

按照 Brown 和 Todd[24] 对戊糖核酸的水解所提出的理論，碱不能使脫氧戊糖核酸水解。在 2-脫氧糖 $C'_{(2)}$ 上沒有羥基，因而不能形成环状磷酸三酯，这是核酸容易被碱水解的必要的先决条件。所以脫氧戊糖核酸能抵抗可使磷酸二酯水解的化学水解作用。

(郑景略　譯)

参考文献

[1] Levene, P. A. and Simms, H. S. *J. biol. Chem.* 1926, **70**, p. 327

[2] Jorpes, E. *Biochem. J.* 1934, **28**, p. 2102

[3] Makino, K. *Hoppe-Seyl. Z.* 1935, **232**, p. 229

[4] Bredereck, H. and Köthnig, M. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1939, **72**, p. 121

[5] Bredereck, H. and Jochman, I. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1942, **75**, p. 395

[6] Levene, P. A. and Simms, H. S. *J. biol. Chem.* 1926, **70**, p. 332

[7] Allen, F. W. and Eiler, J. J. *J. biol. Chem.* 1941, **137**, p. 757

[8] Fletcher, W. E., Gulland, J. M. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1944, p. 34

[9] Chantrenne, H. *Bull. Soc. chim. Belg.* 1946, **55**, p. 5

[10] Chantrenne, H., Linderstrøm-Lang, K. and Vandendriessche, L. *Nature, Lond.* 1947, **159**, p. 877

[11] Vandendriessche, L. *C. R. Lab. Carlsberg, Ser. chim.*1951, **27**, p. 341
[12] Khouvine, Y. and Gregoire, J. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1944, **26**, p. 424
[13] Zittle, C. A. *J. biol. Chem.* 1946, **166**, p. 491
[14] Wiener, G., Duggan, E. L. and Allen, F. W. *J. biol.Chem.* 1950, **185**, p. 163
[15] Cavalieri, L. F., Kerr, S. E. and Angelos, A. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 2567
[16] Cavalieri, L. F., Angelos, A. and Balis, M. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 4902
[17] Cavalieri, L. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 4899
[18] Crestfield, A. M., Smith, K. C. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1955, 216, p. 185
[19] Cox, R. A., Jones, A. S., Marsh, G. E. and Peacocke, A. R. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **21**, p. 576
[20] Jones, A. S. and Peacocke, A. R. *Trans. Faraday Soc.* 1957, **53**, p. 254
[21] Brown, D. M., Magrath, D. I. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1955, p. 4396
[22] Zittle, C. A. *J. Franklin Inst.* 1946, **242**, p. 221
[23] Brown, D. M., Fried, M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1955, p. 2206
[24] Brown, D. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 52
[25] Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1942, **145**, p. 455
[26] See also Verkade, P. E., Stoppelenburg, J. C. and Cohen, W. D. *Rec. Trav. chim., Pays-Bas* 1940, **59**, p. 886
[27] Bailly, M. C. and Gaumé, R. *Bull. Soc. chim. Fr.* 1935, **2**, p. 354
[28] Kumler, W. D. and Eiler, J. J. *J. Amer. chem. Soc.* 1943, **65**, p. 2355
[29] Fonó, A. *Ark. Kemi Min. Geol.* 1947, **24A**, No. 33, p. 1
[30] Brown, D. M., Magrath, D. I. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 2708
[31] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 552
[32] Brown, D. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1953, p. 2040
[33] Brown, D. M. and Todd, A. R. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 409
[34] Gulland, J. M. and Smith, H. *J. chem. Soc.* 1948, p. 1532
[35] Elmore, D. T. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 3681
[36] Cohn, W. E. and Volkin, E. *Nature, Lond.* 1951, **167**, p. 483
[37] Cohn, W. E. and Volkin, E. *J. biol. Chem.* 1953, **203**, p. 319
[38] Markham, R. and Smith, J. D. *Nature, Lond.* 1951, **168**, p. 406
[39] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 558

[40] Brown, D. M., Heppel, L. A. and Hilmoe, R. J. *J. chem. Soc.* 1954, p. 40
[41] Heppel, L. A., Markham, R. and Hilmoe, R.J. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 1152
[42] Heppel, L. A., Whitfield, P. R. and Markham, R. *Trans. Faraday Soc.* 1954, **50**, p. 291
[43] Michelson, A. M., Szabo, L. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1956, p. 1546
[44] Steudel, H. *Hoppe-Seyl. Z.* 1912, **77**, p. 497
[45] Feulgen, R. *Hoppe-Seyl. Z.* 1919, **104**, p. 189
[46] Levene, P. A. and Simms, H. S. *J. biol. Chem.* 1925, **65**, p. 519
[47] Bredereck, H., Köthnig, M. and Lehmann, G. *Ber. dtsch. chem. Ges.* 1938, **71**, p. 613; 1939, **72**, p. 121
[48] Ahlström, L., von Euler, H., Fischer, I., Hahn, L. and Högberg, R. *Ark. Kemi Min. Geol.* 1945, **A20**, No. 15
[49] Hammarsten, E. *Biochem. Z.* 1924, **144**, p. 383
[50] Stenhagen, E. and Teorell, T. *Trans. Faraday Soc.* 1939, **35**, p. 743
[51] Gulland, J. M., Jordan, D. O. and Taylor, H. F. W. *J. chem. Soc.* 1947, p. 113
[52] Signer, R. and Schwander, H. *Helv. chim. acta* 1949, **32**, p. 853
[53] Cosgrove, D. J. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1413
[54] Lee, W. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1951, p. 3361
[55] Cosgrove, D. J. and Jordan, D. O. quoted by Jordan, D. O. *Annu. Rev. Biochem.* 1952, **21**, p. 233
[56] Jordan, D. O., Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 158
[57] Cox, R. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1956, p. 2499
[58] Peacocke, A. R. Special Publication No. 8: The Chemical Society, London, 1957, p. 139
[59] von Euler, H. and Fonó, A. *Ark. Kemi Min. Geol.* 1947, **25A**, No. 3
[60] Little, J. A. and Butler, G. C. *J. biol. Chem.* 1951, **188**, p. 695
[61] Li, C. F., Overend, W. G. and Stacey, M. *Nature, Lond.* 1949, **163**, p. 538
[62] Overend, W. G., Stacey, M. and Webb, M. *J. chem. Soc.* 1951, p. 2450
[63] Lee, W. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 130
[64] Carter, C. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1537
[65] Volkin, E., Khym, J. X. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1533
[66] Koerner, J. F. and Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1957, **228**, p. 1039
[67] Koerner, J. F. and Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1957, **228**, p. 1049
[68] Cunningham, L., Catlin, B. W. and de Garilhe, M. P. *J. Amer. chem.*

Soc. 1956, **78**, p. 4642

[69] Cunningham, L. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 2546

[70] Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1955, p. 2632

[71] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **8**, p. 350

[72] Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1954, **208**, p. 444

[73] Dekker, C. A., Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1953, p. 947

第九章 核酸的結构(二)
脫氧核糖核酸的 Watson 和 Crick 的結构

引 言

从第八章中所提出的証据可以断定脫氧戊糖核酸是由单核苷酸通过 3′—5′ 磷酸二酯鍵的連結而成的多核苷酸。X-射綫結晶学的研究方法对这些核酸大分子結构的研究起着重要的作用，这些研究使人們断定脫氧戊糖核酸分子是由两个多核苷酸鏈缠繞而成的一个双螺旋体，并且通过特殊的氫鍵結合在一起。虽然在个别多核苷酸鏈之間存在着特殊氫鍵的概念最初是从滴定的研究中得来，但从 X-射綫研究討論起将更为方便，这不仅是因为从 X-射綫研究中可以获得更多的結构細节，而且也因为联系到一个特定的分子模型来考虑滴定数据将更为适宜。

X-射綫衍射的研究

通常都是用脫氧戊糖核酸的鈉盐来进行研究，因为它可以用各种不同的方法(参看第二章)从中性溶液中提取出来。值得注意的是某些最佳的 X-射綫衍射图片是从用 Signer 和 Schwander 的方法制备的样品中摄取的。自从 1938 年 Astbury 和 Bell[1] 指出在纤維 X-射綫衍射照片中有一个显著的反射以来就已經知道它是脫氧核糖核酸結构的主要特点之一，这个反射相当于沿着纤維軸上的一个有規則的 3.34Å 长的間距。Astbury 和 Bell 对这个間距的解釋认为是因为扁平的核苷酸一个紧迭在另一个之上并且垂直地突出在纤維軸之外。这个較小的核苷酸間距与干的核酸的較高密度相符合。干的核酸的密度約为 1.62g/cc.。Astbury 和 Bell[1]

以及后来 Astbury[2] 也都是从纤維的图譜上断定核酸結构的图象是沿着分子的軸在每 27Å 处有規則地重复着。假使这些核苷酸是一个迭在另一个之上的話，则这个間距就約相当于每 8 个迭在一起的核苷酸。虽然 Astbury 认为核苷酸堆积的最可能的排列方式是綫形的，但他并沒有完全排斥核苷酸可以按螺旋形圍繞着分子的长軸而排列的可能性。

Astbury 所建議的結构模型一部分是根据这样的假設，即在一个核苷中嘌呤环或嘧啶环的环体系都是和糖环同在一个平面上，或至少是在一个相平行的平面上。但 Furberg[3,4] 指出这个假設是錯誤的，他从 X-射綫的研究証明在胞嘧啶核苷中嘧啶环和糖环几乎是垂直的。具 1.47Å 长度的苷鍵 $N_{(3)}—C'_{(1)}$ 显然是一个单鍵，因此可以繞着鍵軸自由旋轉。但是 Furberg[5] 指出，在晶体中不是所有的糖环和嘧啶环的定向都可能一致，而最适当的位置是 $N_{(3)}—C'_{(1)}—O'_{(1)}$ 和 $N_{(3)}—C'_{(1)}—C'_{(2)}$ 的鍵角各为 109° 和 115°。因为 $C'_{(2)}—C'_{(1)}—O'_{(1)}$ 的鍵角为 111°，所以这两个环系的平面間的夹角約为 90°。图 24 (110 頁) 表示出胞嘧啶核苷的詳細結构。Furberg[3,4] 也曾对尿嘧啶核苷、腺嘌呤核苷和鳥嘌呤核苷的結构做过初步的研究，并断定核苷的一般結构特征都非常相似。对核苷結构的这些結論曾由 Clark、Todd 和 Zussman[6] 及 Zussman[7] 从 2′,3′-亚异丙基-3′,5′-环腺嘌呤核苷的碘化物的 X-射綫研究加以証实。

Furberg 的 X-射綫研究只限于核糖核苷。一般均假定在脫氧核糖核苷中的 $C'_{(2)}$ 上的羥基，若使代以氫原子，則不一定会在結构上发生极显著的变化。这种見解曾被 5′-溴-5′-脫氧胸腺嘧啶核苷的 X-射綫研究所証实[8]。将图 26 中的这个化合物的鍵长和鍵角的数值与图 25 (111 頁，112 頁) 中的胞嘧啶核苷的数值相比較时就証实这两者极其相似。

Furberg[5] 根据他的核苷的結构提出了核酸的另外两种結构(图 27)。这两种結构实际上就是以前 Astbury 所提出的結构的修改。在这些結构中嘌呤环和嘧啶环的平面是与分子的长軸方向

相垂直的，但是糖的部分和 P—$O'_{(3)}$ 鍵則是在和长軸近乎平行的平面中。大多数重复的基团如磷原子、嘌呤环和嘧啶环等的距离約为 3.4Å，这和 Astbury 所发現的基本間距相符合。

随着几种蛋白质螺旋型肽鏈結构的研究成功，Pauling 和 Corey[9,10] 就对核酸提出了一种結构。他們认为这个結构与他們自已所获得的以及与 Astbury 和 Bell 所获得的 X-射綫图譜的主要特征相一致，并且也认为这个結构与核酸的許多化学性质相符合。他們所建議的結构包含有三条缠繞成螺旋形的多核苷酸鏈，每条鏈是由約 24 个核苷酸按右手螺旋缠繞成的七周螺旋体，磷酸基团紧密地环繞着分子的长軸重迭起来，而糖殘基則圍繞这些磷酸基团；嘌呤环和嘧啶环則以輻射状突出着并构成螺旋形的最外层。这些碱基的平面和分子的軸都是近乎垂直的。

虽然 Pauling 和 Corey 的結构毫无疑問地使人們对螺旋結构发生了兴趣，可是仍有几个細节受到批評。溶液中核酸盐离子的一般性质說明磷酸基团不是在分子的內部，而是在分子外面，可以随意地加以接近。支持这种构型的最适当的实驗証据是 Gulland、Jordan 和 Taylor[11] 的滴定数据，他們証明在天然核酸中的磷酸基团可用作酸-碱的滴定，而嘌呤碱和嘧啶碱中的—NH—CO—和氨基的解离因被氫鍵連在一起而不能被滴定。染料和蛋白质吸附的研究也指出磷酸基团容易和大的离子接近。Watson 和 Crick[12] 根据这个結构的許多 van der Waals 的距离太短也对这个結构提出了批評。

鉴于 Pauling 和 Corey 的結构的不可接受的特征，Watson 和 Crick[12~14] 提出了一个新的脫氧核糖核酸結构。这个結构具有許多新奇的特征，而且似乎和大多数的物理的和化学的实驗数据相符合。这个 Watson 和 Crick 的結构，除了在某些細节上还必須加以更改之外，已經被公认为脫氧核糖核酸盐离子的基本結构。这个結构是由缠繞在同一个軸的两条螺旋形的多核苷酸鏈(图28)組成，两者都是右手螺旋，但在这两条鏈中的糖-磷酸酯鏈($C'_{(3)}$、$C'_{(4)}$、$C'_{(5)}$、O·P·O)中的原子排列次序則相反。每一条多核苷酸鏈的一

分子的軸

3.4 Å　3.4 Å　3.4 Å　3.4 Å

• H
○ C,N,O
⊛ P

模型 1　　模型 2

图 27 根据核苷酸的标准构型提出的脱氧戊糖核酸的另外一些結构
(参看图 25, 111 頁)
(S. Furberg: *Acta chem. scand.* 1952, **6**, 637 頁)

34 Å　3.4 Å　10 Å

图 28 Watson 和 Crick 所提出的脱氧戊糖核酸鈉的螺旋結构
(J. D. Watson 和 F. H. C. Crick: *Nature, Lond.* 1953, **171**, 737 頁)

般构型和 Furberg (图 27) 的模型 1 相似，而与嘌呤碱和嘧啶碱有关的糖的构型則和 Furberg[5] 的胞嘧啶核苷中的結构(图 25)相似。所以嘌呤碱和嘧啶碱是在螺旋的內部，而磷酸基团則在螺旋的外部。这也和 Astbury 的 X-射綫数据相符合。这个数据指出随着长軸的方向每隔 3.4Å 的間距就有一个核苷酸。在同一条鏈中的相邻核苷酸間的定向角是假定为 36°，因此在每隔 10 个核苷酸或 34Å 的距离处多核苷酸的結构就重复一次。

核酸結构的最重要的特征可能是这两条鏈是通过在不同的鏈中的嘌呤与嘧啶間的氫鍵結合在一起的形式。碱基的平面是垂直于分子的軸，而分别属于两条鏈的一对碱基都在同一个平面上。每一对这样的碱基都由氫鍵連結在一起。这种成对的碱基很特殊，而且只有某几种碱基对才能适合这样的結构。具有这种特异性的理由是假定在形成每条多核苷酸鏈的骨架糖-磷酸酯鏈是一个直徑为 20Å 的正規螺旋。所以不論是哪一种碱基，苷鍵都是有規則地在空間排列着。特别的是：任何两个連結在以氫鍵相連的碱基对上的苷鍵(分别来自两条鏈)总必須按一定的間距出現，因为它們是連在所假定的有規則的两个骨架上。这种要求的結果就使得以氫鏈相連的碱基对的一半一定是一个嘌呤，而另一半一定是一个嘧啶，这样才能在两条鏈之間形成桥梁。如果这一对碱基对是由两个嘌呤所組成，則在两条鏈之間将沒有足够的空間以容納这个桥梁；如果是由两个嘧啶所組成，則它們之間的距离又嫌太远，不易形成氫鍵。

每一个碱基都能以許多互变的形式存在，其中氫原子是处在不同的确切的位置上。但是，在生理的条件下，每个碱基的某一特定形式要比任何其他形式的可能性更大。假定各种碱基总是以这些最可能的形式出現，則配对的要求就将更加严格，而可能成对的碱基就只有：

腺嘌呤 与 胸腺嘧啶

鳥嘌呤 与 胞嘧啶

按照 Watson 和 Crick[13] 的意見，在这个結构中 5-甲基胞嘧啶或

5-羥甲基胞嘧啶可以代替胞嘧啶。图 29 和 30 表示出这些碱基的成对情況。若使腺嘌呤与胞嘧啶成对,則不能形成氫鍵,因为在一个成鍵的位置附近將有两个氫原子,而在其他成鍵的位置附近則一个氫原子也沒有。同样,如果鳥嘌呤与胸腺嘧啶相連,則邻近成鍵的两个位置就会有两个氫原子。

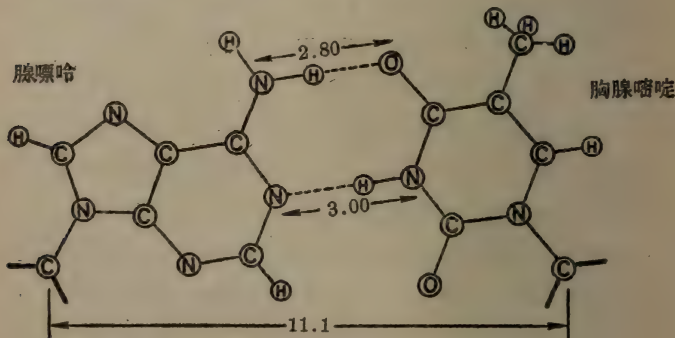


图 29 在腺嘌呤和胸腺嘧啶碱基对中的特殊氫鍵
(J. D. Watson 和 F. H. C. Crick: *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1953, **18**, 126 頁)

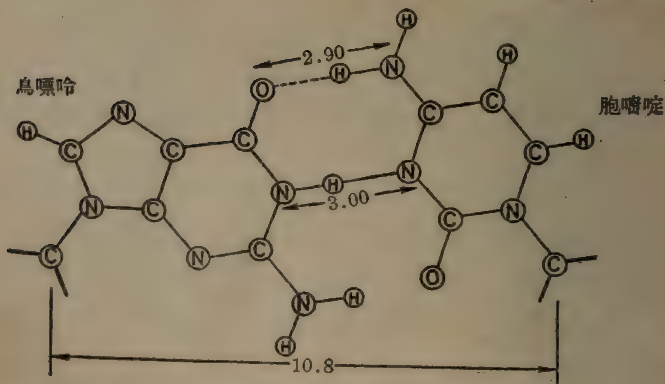
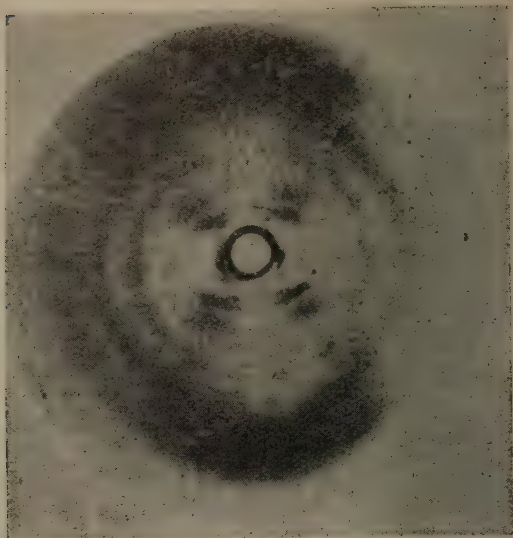


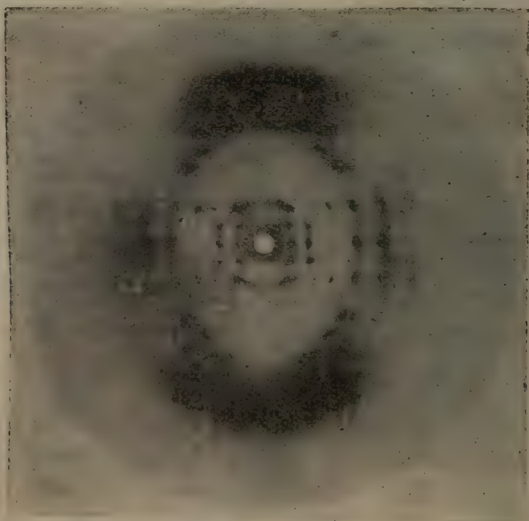
图 30 在鳥嘌呤和胞嘧啶碱基对中的特殊氫鍵
(J. D. Watson 和 F. H. C. Crick: *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1953, **18**, 126 頁)

某一碱基对可以輪替出現。例如，腺嘌呤可以在两条鏈中的任何一条上出現，可是当腺嘌呤在一条鏈上出現时，則在另一条鏈上的它的伙伴一定是胸腺嘧啶。但是，結构对碱基对的次序并沒有限制；在結构中的某一特殊的位置上不論有哪一种碱基对出現，其相邻的碱基对的本性并沒有受到限制。这是因为所有的碱基都是扁平的，而且是一个迭在另一个之上的。虽然沒有排列次序的限制，但是这种特殊的成对要求在两条多核苷酸鏈中的排列次序有一个一定的相互关系。因此，每一条鏈一定与另一条鏈是互相补充的。

这个結构虽然在一定程度上是以 Astbury 和 Bell[1] 以及 Pauling 和 Corey[9,10] 的 X-射綫衍射数据为根据，但大部分还是在制造模型的实际过程中所忆造出来的一种假想的結构，使它能和已經知道的立体化学的数据相一致。結构的一般特征的驗証和原来結构的大小的精确細节以及关于原来結构的若干重要改进都是由 Wilkins[21] 所叙述的由 Wilkins、Stokes 和 Wilson[15]，Franklin 和 Gosling[16~19]，Feughelman、Langridge、Seeds、Stokes、Wilson、Hooper、Wilkins、Barclay 和 Hamilton[20] 以及 Langridge、Seeds、Wilson、Hooper、Wilkins 和 Hamilton[20a] 等的 X-射綫数据所提供的。脫氧戊糖核酸鈉的纤維状晶体可以用針尖从粘稠的核酸盐凝胶中慢慢抽出的方法来制取[18]。所得的晶体具有高度的定向。变換抽出的速度和凝胶的含水量就可以得到直徑在 1 和 100 mμ 之間的纤維。这种纤維可因含水量的不同而产生两种不同类型的 X-射綫衍射图象。纤維的含水量可以用調节晶体周圍大气的相对湿度加以改变。在 75% 的相对湿度下，纤維的含水量相当于纤維干重的 40~50% 时纤維就呈現出一种高度的結晶性，正象在 X-射綫图譜（照片 1）中大量的明显斑点所显示的。这样的核酸形式称为 A 构型[17]。在更高的湿度（92%）下，可以得到另一种不同的結构（B 构型），这种結构常为酟晶的（paracrystalline）。以核酸鈉盐 B 构型形式出現的 X-射綫图譜（照片 2）呈現出很少的清晰斑点。这表明有不完全的結晶性。这种 B 构型似乎在很大的湿度范圍內仍保持不变。一般从 A 型变成 B 型是一种正常的



照片1 A 构型結晶状态脫氧戊糖核酸鈉的 X-射綫衍射图譜
(R. E. Franklin 和 R. G. Gosling: *Acta Cryst*. 1953, **6**, 674 頁)



照片2 B 构型酝晶状态脫氧戊糖核酸鈉的 X-射綫衍射图譜
(R. E. Franklin 和 R. G. Gosling: *Acta Cryst*. 1953, **6**, 674 頁)

可逆变化。

分析大腸杆菌的脫氧戊糖核酸鈉[15]和小牛胸腺的脫氧戊糖核酸鈉[16]的X-射綫图譜可以大致証实 Watson 和 Crick 結构的主要特征。Fanklin 和 Gosling [17,19] 从圓柱体 Patterson 函数的計算,对A型的X-射綫图譜所作的更細致的分析直接証明了这个結构是由两条螺旋形的鏈組成的。一个半徑为 9.0Å 的光滑双鏈螺旋体,其双鏈間的距离相当于单位晶胞 c 軸的一半长度的 Patterson 函数的理論曲綫通过着 Patterson 最高点(图 31)的大部分。整个三度空間的 Patterson 函数指出只有一部分的結构在单位晶胞中在 $c=1/2$ 处的平面上重复着。这正是对 Watson 和 Crick 所

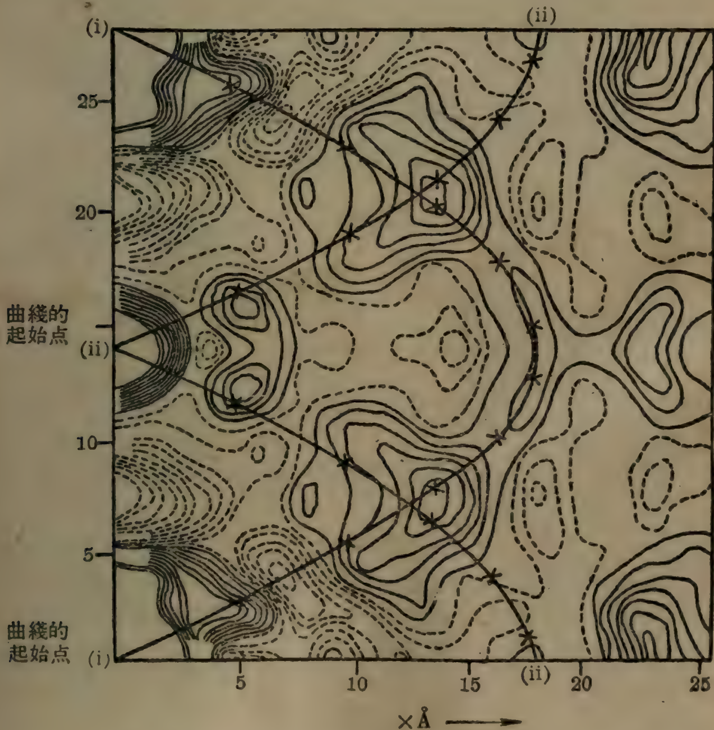


图 31 結晶状态的戊糖核酸鈉的圓柱体 Patterson 函数

(R. E. Franklin 和 R. G. Gosling: *Nature, Lond.* 1953, 171, 156 頁)

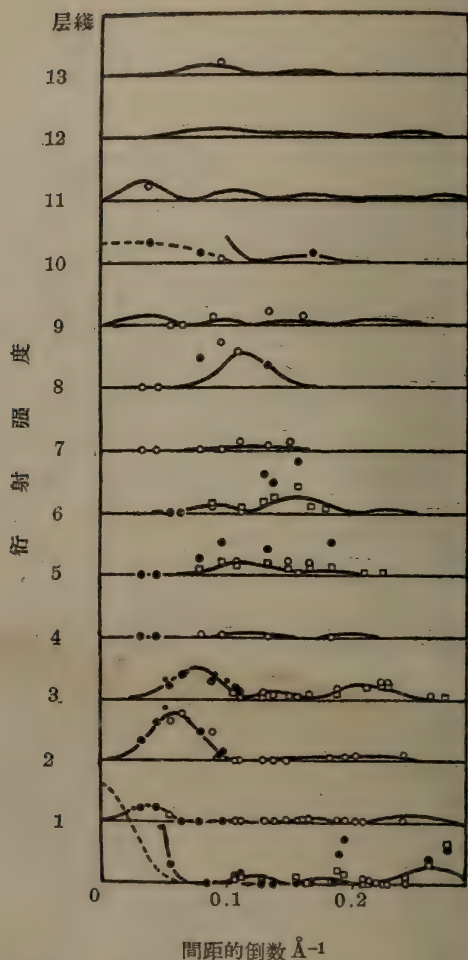


图 32*a* 表示B构型 DNA 鋰盐的观察的衍射强度与計算的衍射强度相符合。較可靠的观察值用黑点表示，可靠性較差的值用同样大小的圓圈表示，小的圓圈表示 DNA 鈉盐的值。光滑曲綫是計算所得的振幅平方的总和。在这些平方項有显著干涉的地方每个X-射綫衍射点的强度是分别計算的，并用方形符号表示。第十层綫上的强度和零点层綫上用点綫表示的曲綫均用 1/10 尺度作图 (R. Langridge, W. E. Seeds, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. F. Wilkins 和 L. D. Hamilton: *J. biophys. biochem. Cytol.* 1957, **3**, 774 頁)

提出的一个双軸的两条同軸鏈的模型所期望的結果。在核酸中沒有第三个同軸的鏈。

Wilkins 及其同工者[20,20a,21]的更精細的 X-射綫研究指出，虽然 Watson 和 Crick 模型的一般特征是正确的，但仍需作若干修改，因为 Watson-Crick 模型的 Fourier 轉变的計算結果和所观察到的 X-射綫图譜不相符合。需要修改的主要特征是分子的直徑，

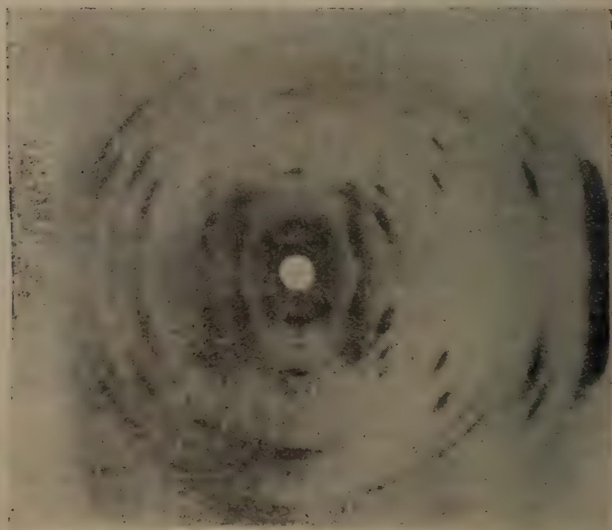
图 32b 脫氧核糖核酸的 B 构型，其中表示出一个碱基对和一个核苷酸在垂直于螺旋軸和双軸的平面上的投影

Watson-Crick 模型中的螺旋軸的位置用 A 表示

(R. Langridge, W. E. Seeds, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. F. Wilkins 和 L. D. Hamilton: *J. biophys. biochem. Cytol.* 1957, **3**, 767 頁)

Watson 和 Crick 估計其为 20Å (带有任意指定的性质)，但实际上是太大了。并且以氢鍵相連的碱基对的形状大約如一根棒，几乎穿过螺旋体的軸[15,20]。如果将 Watson 和 Crick 結构中的碱基对向螺旋体的軸移近，就能和这个特征相符合。这样做法也可以获得减小分子直徑的效果。并且，分子中电子密度的分布不应当在螺旋体某一特定半徑处有突然的变化，而是应当在愈近分子外圍时逐漸地减少。这样在衍射图譜平分綫上的次級衍射最大值的大小就可以减低。若将每个核苷酸中的糖环的平面的排列尽量地向螺旋体的軸傾斜，就可以达到上述的要求。

假使按上述的設想来制造一个脫氧核糖核酸的分子模型，并且也象核糖一样，糖环不是平面的，则将有許多原子間距要比經常所接受的 van der Waals 值小得多。但是，若使根据糖环是平面的假定来制造模型，則这些 van der Waals 距离就比較正常[20]。糖环是平面的假定并不是沒有理由的，因为在核酸盐离子附近存在着許多起源于靜电引力的力。



照片3 B 构型結晶脫氧戊糖核酸鋰的 X-射綫衍射图譜

(M. H. F. Wilkins: *Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1956, 21, 76 頁)

用脫氧核糖核酸的鋰盐和铷盐代替鈉盐[20a]可以在技术上得到更进一步的改进。鋰盐能形成B型的結晶，同时在所得到的X-射綫照片中显示出能准确測量的明确的点(照片3)。鋰盐的另一优点就是鋰离子比鈉离子所散射的X-射綫大約要少三倍，因此在根据分子模型来計算衍射强度时可以忽略不計。采用所接受的立体化学数据，Dunitz和Rollett[22]对二苄基磷酸所提的数据，以及

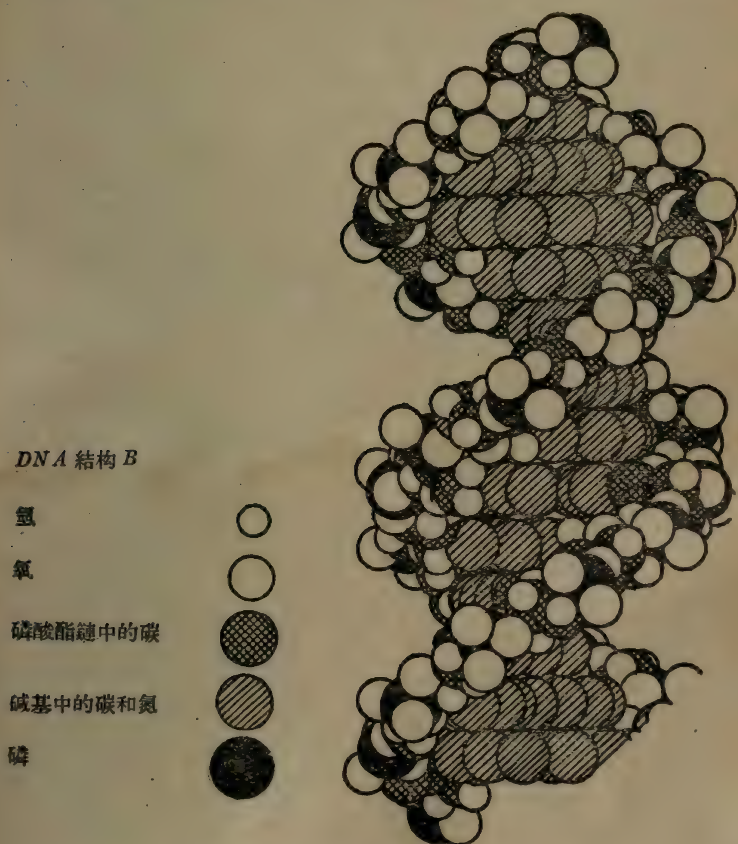


图33 假想的B型脫氧核糖核酸鈉的結构
(M. Feughelman, R. Langridge, W. E. Seeds, A. R. Stokes, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. F. H. Wilkins, R. K.Barclay 和 L. D. Hamilton: *Nature, Lond.* 1955, **175**, 834 頁)

Huber[8] 对 5′-溴-5′-脱氧胸腺嘧啶核苷所提的数据以制造分子模型时，可以得到从分子模型所計算出来的和从实验所測得的衍射强度間[21]的滿意的一致性(图 32*a*)。图 32*b* 表示出在这个模型中的碱基对对螺旋体和双軸的相对位置。从这个模型中可以看出与原来 Watson 和 Crick 所提出的位置相比較时(图 32*b* 中的A)，螺旋体的軸穿过了以氫鍵相連的环系統。图 33 是分子的实体模型。图 34 表示出 A 和 B 两种构型的差别。Sutherland 和 Tsuboi[23] 的紅外光譜研究有力地証实了这个模型。

这两种模型的主要尺寸和特征可以概括如下。在 A 型的螺旋体中，两条多核苷酸鏈构成直徑为 18Å 的螺旋体，这两条鏈以 14Å 的距离沿着螺旋体的軸盘旋。螺旋体的螺距为 28.1 Å，而在每条鏈中螺旋环繞一周时有 11 个核苷酸。所有的碱基对均成横棒并对螺旋的軸傾斜約 65°，但不通过这个軸。在 B 型的螺旋体中，螺距为 33.1 Å，每一周期中核苷酸的数目則减少为 10。碱基对所形成的横棒則垂直于螺旋体的軸并通过它。螺旋的直徑較小(图 34)。

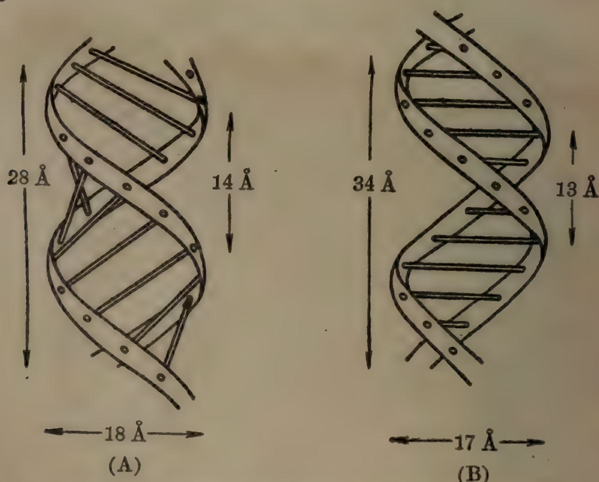


图 34 假想的脫氧戊糖核酸鈉 A 型和 B 型模型之間的主要差別
(G. B. B. M. Sutherland 和 M. Tsuboi: *Proc. Roy. Soc.* *A* 1957, **239**, 459 頁)

最近 Pauling 和 Corey[24] 曾指出在胞嘧啶和鳥嘌呤的碱基对中，鳥嘌呤上氨基的氫原子和胞嘧啶上羰基的氧原子間还可能存在着第三个氫鍵（图 35）。这个第三个氫鍵的存在使鳥嘌呤-胞嘧啶碱基对比腺嘌呤-胸腺嘧啶碱基对更为稳定。这已經被不同組成的脫氧戊糖核酸的热变性的实驗所証实。脫氧戊糖核酸中含鳥嘌呤和胞嘧啶成分高的具有較高的变性温度（参看第十一章，图 76，265 頁）。

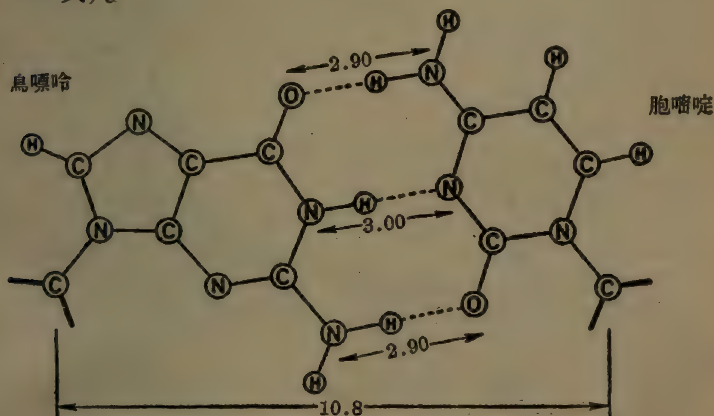


图 35 根据 Pauling 和 Corey[24] 的鳥嘌呤和胞嘧啶碱基对中特殊的氫鍵

电位滴定的研究

在以測定小牛胸腺脫氧核糖核酸中核苷酸間成鍵基团的性质为主要目的的电位滴定研究中，Gulland、Jordan 和 Taylor[11] 观察到，当原先在 pH 6～7 的脫氧核糖核酸鈉溶液滴定到 pH 2.5 或 pH 12 时所得到的滴定曲綫是不可逆的，并且与分别用碱和酸反滴定时所获得的曲綫有明显的差别。这种現象表示在图 36 中。显然，将酸或碱加到脫氧核糖核酸盐中在开始时并不引起酸性和碱性基团的电离，并且非緩冲区由反滴定曲綫中的 pH 6～9 扩大到原来滴定曲綫中的 pH 4.5～11.0。在这些界限以外，酸-碱基团迅速游离，并在 pH 2.0～6.0 和 pH 9.0～12.0 范圍內参加滴定。按

照 Gulland、Jordan 和 Taylor[11] 的意見，不管滴定是否从 pH 12 或 2.5 开始都可以得到相同的反滴定曲綫。这种小心制备的脫氧戊糖核酸样品的滴定行为已經被 Signer 和 Schwander[25]，Cosgrove 和 Jordan[26] 以及 Lee 和 Peacocke[27] 从其他来源和用不同方法制备的脫氧戊糖核酸所做的滴定加以証实。Shack 和 Thomp-

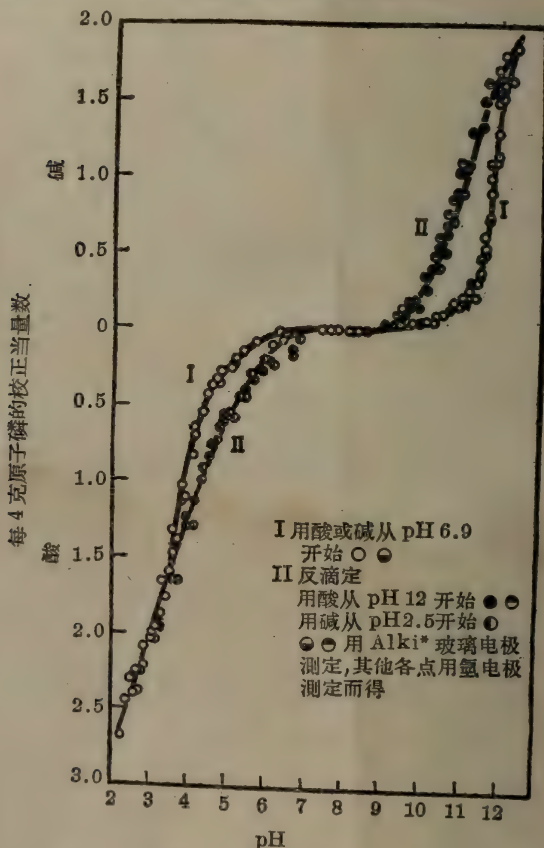


图 36　小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的滴定曲綫

通过 I 中各点画出的平滑曲綫是从 pK_a' 值 2.6、3.5、5.2、10.4 和 11.4 按 1 个当量計算出来的

* Cambridge Instrument Company, Ltd.

(J. M. Gulland, D. O. Jordan 和 H. F. W. Taylor: *J. chem. Soc.* 1947, 1132 頁)

sett[28] 用分光光度滴定法也对此予以証实。

Gulland、Jordan 和 Taylor 对这个滴定現象的解釋是：嘌呤碱和嘧啶碱的氨基是通过氫鍵与基团 —NH—CO— 相連，因此根据实驗数据，当一个基团被滴定时就会引起两个基团的游离。Creeth、Gulland 和 Jordan[29] 用粘度数据証明这些鍵是分子間的鍵，而不是分子內的鍵。他們观察到在基团产生电离的那些 pH 值下，脫氧核糖核酸盐溶液的粘度就显著下降，流动双折射也伴随着粘度的下降而消失[29~31]（图 37 和 38）。这种現象只能解釋为氫鍵

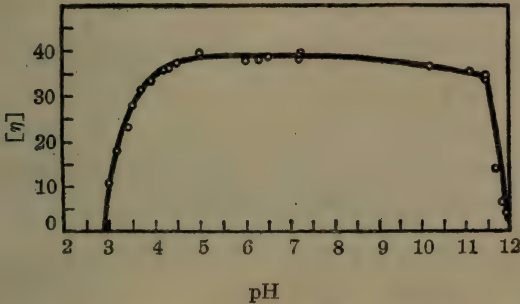


图 37 小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的特性粘数随着 pH 值的改变
(摘自 A. R. Mathieson 和 S. Matty: *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, 759 頁)

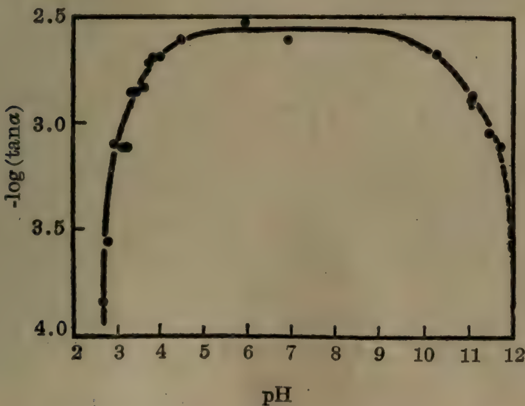


图 38 小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的流动双折射随着 pH 值的改变
(A. R. Mathieson 和 S. Matty: *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, 758 頁)

所連結的結构受到破坏而产生了更小的分子单位或一个不对称性較小的大分子。

現在根据 Watson 和 Crick 的模型可以透徹地解釋这些結果。連接核苷酸中特殊碱基对（图 29 和 35）的氫鍵与腺嘌呤、鳥嘌呤和胞嘧啶的氨基以及鳥嘌呤和胸腺嘧啶的—NH—CO—基团有关。氫鍵环体系的稳定性使参加环体系組成的基团的酸、碱强度降低，因此就解釋了原先滴定曲綫的不可逆性。

自从这种現象首次被发現后，精密滴定的技术就被应用于解决离子强度和核酸盐濃度对于滴定曲綫的影响，从 pH 2.0 和 12.0 反滴定曲綫的一致性以及測定多核苷酸中解离基团的解离常数等問題。

Jordan、Mathieson 和 Matty[32] 与 Cox 和 Peacocke[33] 曾指出在很大的离子强度和核酸盐濃度的范圍內可以观察到不可逆滴定的現象(有时不正确地称之为滞后現象)。按照双螺旋模型来看，这就意味着这种現象并不是由于分子間的相互作用，而是由眞正分子內(或多核苷酸間)的鍵所产生的。

采用从色层分析法所获得的脫氧核糖核酸盐的嘌呤碱和嘧啶碱的組成可以确定沒有任何可檢出的二級磷酸解离。也能够測定在 25°C 时氨基的滴定常数（pG′ 值）[34]。这些数值是：

	鳥嘌呤	腺嘌呤	胞嘧啶
pG′，正向滴定	2.50	4.40	4.40
pG′，逆向滴定	2.40	3.65	4.85

由此可見腺嘌呤和胞嘧啶在正向滴定中具有相同的 pG′ 值，但是 pG′ 值在逆向滴定中相差就很大。檢查 Watson 和 Crick 模型(图 29 和 35)的氫鍵环体系时証明腺嘌呤和胞嘧啶的氨基都是极其相似的八原子环的組成单位。这些环在滴定时必然断裂。因此在氫鍵連接和非氫鍵連接的形式中这些基团的 pG′ 值都不相同，而在氫鍵連結的形式中，它們的 pG′ 值都是相同的，也就不足为奇。鳥嘌呤在正向和逆向滴定曲綫中 pG′ 值的相似有时被认为是因为鳥嘌呤中的氨基不参加形成碱基間的氫鍵。但是，Cavalieri 和

Rosenberg[35] 指出在 1°C 时正向和逆向滴定曲綫間的差别在整个鳥嘌呤氨基的滴定中都存在(参看第十一章,图 70, 258 頁), 因此証明了这个氨基也参与氫鍵的形成。滴定曲綫随着温度的改变一部分是因为酸变性和热变性之間的相互依賴关系(参看 257 頁)。

虽然 Gulland、Jordan 和 Taylor 原先的滴定曲綫与逆向滴定曲綫是完全一致的, 可是这始終沒有被新近的研究[27,33] 所証实。按照 Peacocke[36] 的見解, 它具有結构上的意义, 因为如果这两条反滴定曲綫是完全一致的, 那就必須排除所假設的氨基和—NH—CO—間的各种不稳定的連接(参看第八章, 151 頁), 这就証明在它們中間唯一可能的連接方式是氫鍵。

Cox 和 Peacocke[33] 在一个能准确掌握离子强度的、沒有接液的电池中用一种不連續的方法测定了鯡魚精子的脫氧戊糖核酸鈉的解离曲綫(在一般的滴定方法中是用一个玻璃电极或氫电极, 并連續地加碱或加酸; 因此在滴定过程中溶液的离子强度并不是恒

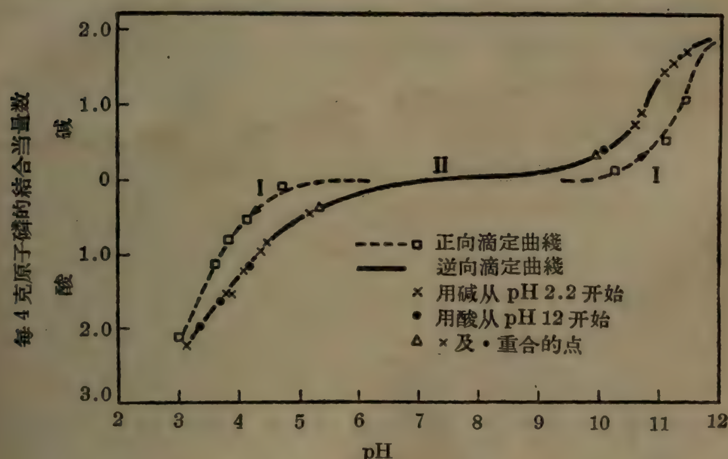


图 39 在沒有接液的电池中对鯡魚精子脫氧核糖核酸鈉个别混合物所作的滴定 (25°C, 离子强度 0.05)

I. 正向滴定曲綫由 pH 6～7 用酸滴定到 pH 2.2 或用碱滴定到 pH 12;

II. 逆向滴定曲綫

(A. R. Peacocke: Special Publication of the Chemical Society No. 8, London, 1957, 151 頁)

定的)。图 39 表示出一組实驗的結果,其中每一个点都代表着对个别混合物的几次测定的結果。氨基或 —NH—CO— 基团分别在 pH 2 或 12 时电离后在反滴定中所获得的点都完全分布在同一条完全是可逆的滴定曲綫上。因此 Peacocke[36] 断定氨基一定是以氫鍵与 —NH—CO— 基团相連,而在电离时氫鍵才断裂。这就指出了可用滴定方法檢出的基团很少是以其他方式連結的。先前所观察到的反滴定曲綫間的差别一定是由于与連續滴定方法有关的因素所引起。

Watson 和 Crick 模型的分析化学証明

以氫鍵相連的双螺旋中的特殊碱基还具有这样的关系，即在核酸分子中每有一个鳥嘌呤殘基就一定有数目完全相等的胞嘧啶殘基。同样,腺嘌呤和胸腺嘧啶也一定是以等量存在的。許多脫氧戊糖核酸的分析数值証明这个关系是近乎准确的，虽然在各种不同样品的核酸中腺嘌呤对鳥嘌呤的比值可以相差很大。表 6 (第四章, 87 頁) 說明了这个关系, 其中第 7 行和第 8 行分别列出了腺嘌呤对胸腺嘧啶和鳥嘌呤对胞嘧啶 (加上 5-甲基胞嘧啶) 的比值。几乎在任何情形下(肺炎双球菌 III 型除外) Watson 和 Crick 模型所預示的等于 1 的比值都沒有显著的偏离，虽然腺嘌呤和胸腺嘧啶对鳥嘌呤和胞嘧啶的比值(第 9 行)却在很大范圍內发生变化。实际上这个比值就是腺嘌呤对鳥嘌呤的比值。Watson 和 Crick[14] 认为这些分析数据对証实他們的模型提供了极重要的实驗証据。但是,表 1 (第三章,50 頁)所載的 Bendich 及其同工者从核酸的各个級分中所得到的极仔細的分析数值証明腺嘌呤对胸腺嘧啶以及鳥嘌呤对胞嘧啶的比值在某些級分中和 1 相差很远。这必然表明在某些級分中的分子所含的腺嘌呤殘基要比能与胸腺嘧啶以氫鍵相連的腺嘌呤殘基更多。这一事实可能具有遺傳学上的意义，并且是表示从一个整个样品中所获得的等于 1 的总比值可能是偶然的。在对个别級分用滴定和其他方法进行有系統的研究

以前，这个观察的眞实意义还不能評定。虽然如此，由于这个新証据的发現，这些分析数据不能当作可以支持一度所主張的 Watson 和 Crick 的模型[14]。

Watson 和 Crick 結构的可能的修改

Watson 和 Crick 的結构是假定单独的脫氧戊糖核酸分子含有两条多核苷酸鏈，它們在整个分子中是連續的，并且由特殊的氫鍵連結在一起。假使多核苷酸鏈是不連續的，而在整个分子长度中有不規則的或有規則的間断，則只要这两条鏈中的間断不是发生在相对的位置上(显然当間断发生在相对位置时，分子将分裂为二)，就不会影响到 X-射綫照片。Jordan[37] 提出过一个推測性的建議，认为在脫氧戊糖核酸分子中可能存在着一种間断性的結构，但 Dekker 和 Schachman[38] 根据实驗的証据和 Watson-Crick 的模型曾提出一个比較肯定的結构。对这个模型所提的証据，大半是从研究溶液中核酸盐离子的大小和形状以及在能使氫鍵断裂的(变性)試剂中所得的結果而来的。关于这些方面的問題将在第十章和第十一章中作更詳尽的討論。

假使脫氧戊糖核酸的分子含有两条由氫鍵連結在一起的不連續的多核苷酸鏈，則显然因全部氫鍵被破裂后所得到的产物的分子量将比較小，并且在溶液中有可能相互扩散而分开。在另一方面，在同一条件下連續的結构只能产生两条鏈，每条鏈具有原来分子量的一半。因为这两条鏈是纏繞在一起的，因此不容易把它們分开。这两种見解曾受到很多互相矛盾的实驗証据的支持。支持不連續結构的証据大半根据每 20 个或 30 个核苷酸中有 1 个二級磷酸基团存在的事实，这可从用氫鍵断裂剂(如酸、碱)或加热处理后測定所得的分子的大小和原始滴定的数据来証实。但是，較新的滴定証据并沒有証明有末端二級磷酸基团(参看上面)存在，而且 Doty 和 Rice[39] 的光散射測定指出当氫鍵受热或低 pH 的影响断裂后，脫氧戊糖核酸的分子量并沒有改变。因此这似乎是原来

所設想的連續結构和目前的实驗証据更加符合。

(郑景略 譯)

参考文献

[1] Astbury, W. T. and Bell, F. O. *Nature, Lond.* 1938, **141**, p. 747; *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1938, **6**, p. 109; *Tabul. biol., Hague* 1939, **17**, p. 90

[2] Astbury, W. T. *Symp. Soc. exp. Biol.* 1947, **1**, p. 66

[3] Furberg, S. *Nature, Lond.* 1949, **164**, p. 22

[4] Furberg, S. *Acta Cryst.* 1950, **3**, p. 325

[5] Furberg, S. *Acta chem. scand.* 1952, **6**, p. 634

[6] Clark, V. M., Todd, A. R. and Zussman, J. *J. chem. Soc.* 1951, p. 2952

[7] Zussman, J. *Acta Cryst.* 1953, **6**, p. 504

[8] Huber, M. *Acta Cryst.* 1957, **10**, p. 128

[9] Pauling, L. and Corey, R. B. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 346

[10] Pauling, L. and Corey, R. B. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1953, **39**, p. 84

[11] Gulland, J. M., Jordan, D. O. and Taylor, H. F. W. *J. chem. Soc.* 1947, p. 1131

[12] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 737

[13] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Proc. Roy. Soc. A* 1954, **223**, p. 80

[14] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1953, **18**, p. 123

[15] Wilkins, M. F. H., Stokes, A. R. and Wilson, H. R. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 737

[16] Franklin, R. E. and Gosling, R. G. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 740

[17] Franklin, R. E. and Gosling, R. G. *Nature, Lond.* 1953, **172**, p. 156

[18] Franklin, R. E. and Gosling, R. G. *Acta Cryst.* 1953, **6**, p. 673

[19] Franklin, R. E. and Gosling, R. G. *Acta Cryst.* 1953, **6**, p. 678

[20] Feughelman, M., Langridge, R., Seeds, W. E., Stokes, A. R., Wilson, H. R., Hooper, C. W., Wilkins, M. F. H., Barclay, R. K. and Hamilton, L. D. *Nature, Lond.* 1955, **175**, p. 834

[20a] Langridge, R., Seeds, W. E., Wilson, H. R., Hooper, C. W., Wilkins, M. F. H. and Hamilton, L. D. *J. biophys. biochem. Cytol.* 1957, **3**, p. 767

[21] Wilkins, M. F. H. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1956, **21**, p. 75

[22] Dunitz, J. D. and Rollett, J. S. *Acta Cryst.* 1956, **9**, p. 327

[23] Sutherland, G. B. B. M. and Tsuboi, M. *Proc. Roy. Soc. A* 1957, **239**, p. 446

[24] Pauling, L. and Corey, R. B. *Arch. Biochim. Biophys.* 1956, **65**, p. 164
[25] Signer, R. and Schwander, H. *Helv. chim. acta* 1949, **32**, p. 853
[26] Cosgrove, D. J. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1413
[27] Lee, W. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1951, p. 3361
[28] Shack, J. and Thompsett, J. M. *J. biol. Chem.* 1952, **197**, p. 17
[29] Creeth, J. M., Gulland, J. M. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1947, p. 1141 (see also ref. 30)
[30] Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 747
[31] Vilbrandt, C. F. and Tennent, H. G. *J. Amer. chem. Soc.* 1943, **63**, p. 1806
[32] Jordan, D. O., Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 158
[33] Cox, R. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1956, p. 2499
[34] Jordan, D. O., Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 154
[35] Cavalieri, L. F. and Rosenberg, B. H. *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, p. 5352
[36] Peacocke, A. R. Special Publication No. 8: The Chemical Society, London, 1957
[37] Jordan, D. O. *Progr. Biophys.* 1952, **2**, p. 51
[38] Dekker, C. A. and Schachman, H. K. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1954, **40**, p. 894
[39] Doty, P. and Rice, S. A. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **16**, p. 446

第十章　核酸的結构(三)

溶液中脫氧戊糖核酸盐离子的大小、形状和另外几种性质

引　言

象 Watson-Crick 模型所描繪的，脫氧戊糖核酸盐离子的詳細分子結构，正象第九章中所指出的，絕大部分是根据 X-射綫对具有高度結晶性的濃凝胶所作的研究。同等重要的是应用胶体化学的技术来研究溶液中的脫氧戊糖核酸盐离子，这些研究使人們得到关于这些离子在溶液中的分子量、大小、形状和剛性的知識。与作为某一制备物常数的分子量相比时，与氫鍵的連接、范德华力、离子間力(inter-ionic force)和动力平衡有关的核酸盐大分子离子的形状是随着环境的不同而改变的。因此，核酸盐大分子离子的形状和剛性的改变常随着溶液的离子强度和 pH 而改变。这些在分子形态学上的改变的生物学意义是与它們轉移給核蛋白的程度有关。到目前为止，对核蛋白溶液的性质所进行的研究并不象对核酸溶液的性质所进行的研究那样深入。虽然如此，在离子环境改变比較小的情况下所发生的脫氧戊糖核酸盐离子形状和剛性的改变，在一个分子中不能不认为是重要的，因为人們相信这个分子能傳递遺傳信息，并能利用一种模板作用机制自行复制。

脫氧戊糖核酸溶液的物理化学测定必須在精确的特定条件下进行，但对溶液的制备和濃度的测定还存在着一些困难。不同的方法經常被不同的研究工作者所采用，而这些方法应对所报道的矛盾結果負有部分責任。脫氧戊糖核酸的鈉盐在水中比在电解质溶液中容易溶解。但是，現在已經明白，象将在第十一章中指出的，当脫氧戊糖核酸鈉溶于水中，使溶液的濃度小于

$2\times10^{-4}M(6\times10^{-5}g/ml)$时，或溶于濃度低于$10^{-3}M$的氯化鈉溶液中时，会发生不可逆的变性。因此，如果要保持脱氧戊糖核酸的天然状态，则将其先溶解在水中，然后再加入电解质并不是一个滿意的方法；对水的完全透析亦应避免。象过去所实現的，将脱氧戊糖核酸溶解在水中和溶解在电解质溶液中并不一定立刻产生一个眞正的分子分散的溶液，而是产生一个可能含有脱氧戊糖核酸盐离子聚集物的溶液，这些聚集物只能緩緩地解聚。少量杂质如蛋白质的存在[1]有助于聚集作用。根据所进行的测定的性质，这些聚集物的存在会导致两种不同的誤差。如果象在沉降实驗的最初阶段或在光散射测定前所进行的澄淸步驟中将聚集物用离心方法除去，则对核酸盐来讲，溶液的濃度将发生改变；假如这些聚集物不用一些必要的預先处理步驟将其除去而仍保留在溶液中，则在进行粘度或其他流体力学的测定时，这些聚集物的存在会引起眞正的实驗誤差。

因此在制备溶液时应推荐将脱氧戊糖核酸鈉分散在濃度不低于$10^{-3}M$的氯化鈉溶液中的方法，并且不宜有过多的攪动，在冷处放置几小时（例如过夜）让溶液形成（同样的最低濃度适用于所有的1–1价的电解质溶液；对于2–1价的电解质溶液，例如氯化鎂来讲，其最低濃度比这个濃度还要低得多）。脱氧戊糖核酸鈉在低离子强度的溶液中的溶解速度一般較快，因此假如需要离子强度高的溶液，则在开始时必須先用$10^{-3}M$氯化鈉溶液将脱氧戊糖核酸鈉溶解，然后再加入更多的电解质，以增加其濃度。所得的溶液必須用18000～20000g轉离約一小时。也可以应用更高的离心力，但必須注意防止分子状态分散的核酸盐离子发生任何分級分离。应用这样的操作方法，Butler、Laurence、Robins和Shooter[2]曾在不同核酸制品的物理化学测定中观察到其重复性的显著改进。

用这种方法制备的溶液的精确濃度是不知道的。人們怀疑到底能否测定核酸溶液的絕对濃度，因为所有的测定，不論其是否与磷的分析或紫外吸收的测定有关，終究是以固体脱氧戊糖核酸鈉样品重量的测定为根据的。脱氧戊糖核酸鈉与空气中湿气成平衡

时的含水量是高的，而且是不恒定的。虽然在110°C或在較低的温度下可进行真空干燥到能够重复的恒重标准，但此时水分不一定完全除去。許多实驗室所采用的有用的标准方法是繪制一个能够表示在259 mμ处的紫外吸收与濃度关系的标准对照曲綫。这样的标准曲綫是从测定脫氧戊糖核酸鈉在4%氯化鈉溶液中的紫外吸收得到的(因为在电解质濃度低时,紫外吸收会随电解质濃度发生变化,因此需要用高的电解质濃度)。脫氧戊糖核酸鈉氯化鈉溶液的制备是称取干燥至恒重的样品按照合适而能够重复的标准步驟进行的。

脫氧戊糖核酸鈉溶液在pH 7的电解质溶液中可以在0°C或更低的温度下保存相当长的时間而不致发生可覺察的降解。

脫氧戊糖核酸鈉的分子量

一般用于測定分子量的方法是将沉降系数和扩散系数同时代入Svedberg方程式[3]，将沉降系数和特性粘数同时代入Mandelkern、Krigbaum、Scheraga和Flory方程式[4]以及应用光散射方法。

Tennent和Vilbrandt[5],Cecil和Ogston[6],Stern和Atlas[7]以及Kahler[8]所首先測定的脫氧戊糖核酸盐离子的沉降系数可以用来表示在0.2 M氯化鈉溶液中在2.5×10^{-3} g/ml以下濃度时的沉降系数对濃度的明显依賴关系。这些測定是应用Philpott-Svensson、Schlieren光学系統和一个能容12 mm液柱的液槽来进行的。能够利用这个实驗系統来进行研究的脫氧戊糖核酸鈉溶液的低濃度极限在正常情况下約为3×10^{-4} g/ml。这个低濃度极限是用測定溶质折光率的增加来測定的，虽然在稍微低于这个极限濃度的測定亦曾有所报道。因为在这个濃度范圍內沉降系数值很快地随着稀釋而增高(参看图40)，因此用外推法求得在无限稀釋时的沉降系数值是不可能高度准确的。虽然如此，Kahler[8]和Ogston[9]根据濃度低到3×10^{-4} g/ml时的測定試图在假定函

数 $1/S_{20}$(S_{20} 是在 20°C 时溶剂粘度已校正过的沉降系数) 与濃度成直綫关系的基础上应用了外推法。他們用这种方法所得到的在无限稀釋时的 S°_{20} 数値分别为 12.5S 和 13.2S (Svedberg 单位)。Peacocke 和 Schachman[10] 用同样大小的液槽测定了濃度低至 1×10^{-4} g/ml 时的小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的沉降系数：濃度范圍在 $1\sim8\times10^{-4}$ g/ml 之間时，$1/S^{\circ}_{20}$ 与濃度成直綫关系；外推至无限稀釋时的小牛胸腺脫氧核糖核酸盐的沉降系数約为 21S。

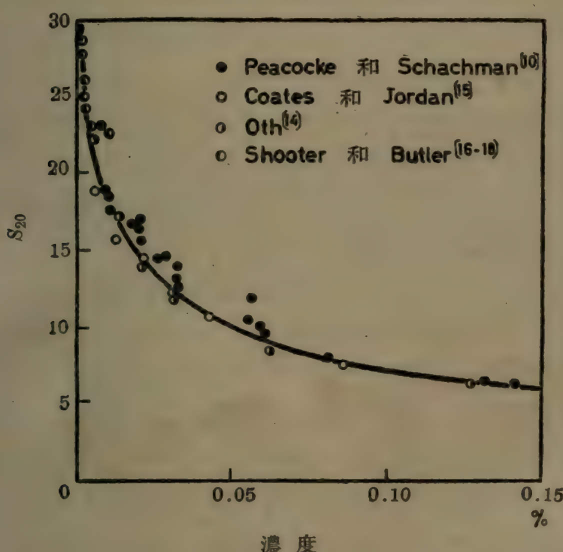


图 40 小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的沉降系数随濃度的变化

Kahler 和 Shack[11] 与 Doty、McGill 和 Rice[12] 以及 Kawade 和 Watanabe[13] 从濃度范圍分别为 $3\sim6\times10^{-4}$g/ml、$1.5\sim7.5\times10^{-4}$ g/ml 和 $2\sim32\times10^{-4}$g/ml 的測定中曾得到在无限稀釋时的相似的沉降系数値，这些数値高于 Kahler 和 Ogston 原来所得到的。Kahler 和 Shack[11] 与 Doty、McGill 和 Rice[12] 外推 $1/S_{20}$ 到濃度为零时所得到的 S°_{20} 数値分别为 20S (在 0.3 M 氯化鉀中) 和 22 S (在 0.2 M 氯化鈉中)。Kawade 和 Watanabe[13] 发現函数 $S^{\circ}_{20}(1+[\eta]c)$随着濃度而直綫地改变，其中$[\eta]$为特性粘数，$c$ 为

濃度。当将这个函数外推到濃度为零时,則得到的 S_{20}° 值为 23 S。从鲱魚精子的脫氧核糖核酸盐所得到的沉降系数值則較低。Kahler[8] 和 Ogston[9] 所得到的低沉降系数值与 Peacocke 和 Schachman[10]、Kahler 和 Shack[11] 以及 Kawade 和 Watanabe[13]所得到的低沉降系数值之差,不能只归因于外推法的不准确,因为后几个研究工作者几乎肯定地应用了更好的脫氧戊糖酸鈉的制品。

对濃度大于約 $2\sim5\times10^{-4}$ g/ml 的溶液所进行的測定是否能够加以外推,以致在濃度为零时的数值是一个有意义的数值是值得怀疑的。为了要得到一个在无限稀釋时的有意义的数值,需要对这样稀的溶液进行測定,即溶液中的分子之間几乎沒有相互关系。对球狀蛋白质来讲,可以作为有意义測定的濃度范圍可高达 5×10^{-2} g/ml;但对核酸来讲則低得很多,而 $2\sim5\times10^{-4}$ g/ml 已是高濃度的极限。因此很需要将測定方法加以改进,使能在尽可能低的濃度溶液中进行測定。

使用能容 30 mm 液柱的液槽或紫外吸收光学系統,曾获得了在更低濃度时的沉降系数值。前一个方法可以在濃度低到約 6×10^{-5} g/ml 时进行測定,而后一个方法則能够很容易地在濃度低到 1×10^{-5} g/ml 时进行測定。濃度低至 1×10^{-7} g/ml 时的溶液亦曾經測定过。Oth[14],后来 Coates 和 Jordan[15] 应用一个 30 mm 的液槽測定了用去污剂法提取(参看第二章,参考文献 60)的小牛胸腺脫氧核糖核酸盐制品在濃度范圍为 $6.3\sim12.6\times10^{-5}$ g/ml 时的沉降系数(图 40)。应用函数 $1/S_{20}$ 的关系,外推到濃度为零时得到 S_{20}° 的数值为 29.4S[14]。但是,Shooter 和 Butler[16~19] 应用紫外光学系統曾得到在低濃度时的最广泛的沉降系数值。他們的結果(图 41)指出,S_{20} 与在 $5\sim1\times10^{-5}$ g/ml 之間的濃度的关系是近乎直綫的。外推至无限稀釋时,对用去污剂法提取所得到的小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的 S_{20}° 值約为 29 S。这个数值与 Oth 的結果非常符合。用酶促水解制备小牛胸腺脫氧核糖核酸盐样品(参看第二章,参考文献 63)的沉降系数值則較低,約为 24 S。

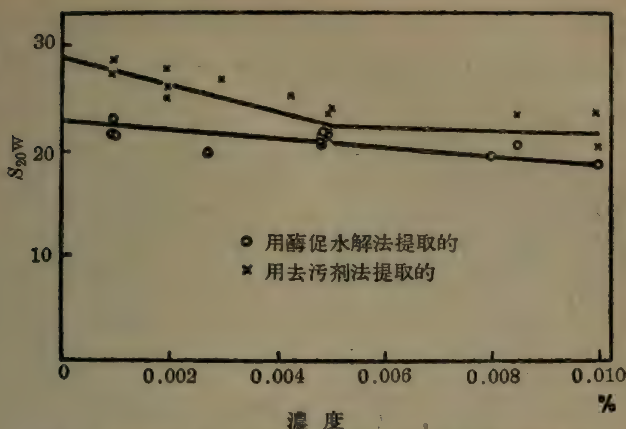


图 41 在 0.2*M* 氯化鈉溶液中在低濃度时脱氧戊糖核酸鈉的沉降系数值随濃度的变化

(K. V. Shooter 和 J. A. V. Butler: *Trans. Faraday Soc.*1956, **52**, 738頁)

Doty、McGill 和 Rice[12] 曾测定了小牛胸腺脱氧核糖核酸鈉的沉降常数与分子量之間的实驗关系。这个关系可以普遍地加以应用，因为 Barbu、Joly、Robins 和 Shooter[20] 曾指出这个同样的关系亦可适用于从 *Samonella enteritidis* 噬菌体 D4 中所得到的脱氧戊糖核酸盐。Doty、McGill 和 Rice[12] 用光散射法测定了用超声波降解的脱氧核糖核酸盐的分子量。从以后的超声波碎片变性的研究結果看来，已經很清楚，在用超声波处理时，若是有单鍵断裂，則亦很少发生，因此超声波碎片是原来核酸盐的同系物，仍具有以氫鍵連接的 Watson-Crick 双螺旋結构。亦曾获得了在分子量从 7.4×10^6(原来物质)到 3×10^5 范圍內的級分，并发現下面的式子亦可适用于分子量与沉降系数的关系：

$$S_{20}^{\circ}=0.063\,M^{0.37}$$

这个关系式可以用于估計用紫外光学系統对稀溶液作沉降研究时从沉降分布所得到的脱氧戊糖核酸鈉的分子量分布情況。

Stern 和 Atlas[7] 曾测定了在氯化鈉溶液中电解质濃度对脱氧戊糖核酸鈉沉降系数的影响；Kahler 和 Shack[11] 也测定了在氯化鎂溶液中电解质濃度对脱氧戊糖核酸鈉沉降系数的影响。在

这两个实例中,沉降系数都随着电解质濃度的增加而迅速地增大;在氯化鈉的濃度为 $0.2M$ 和氯化鎂的濃度为 $0.05M$ 时,則到达极限值(图 42)。

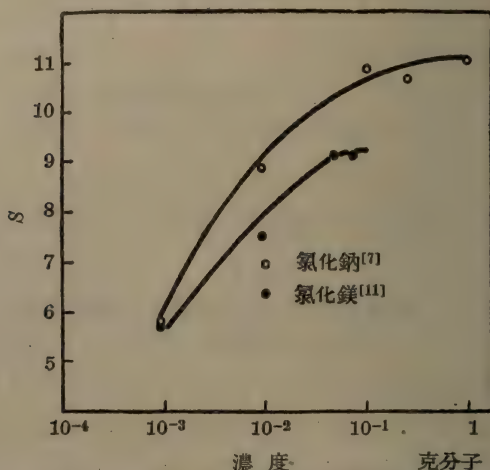
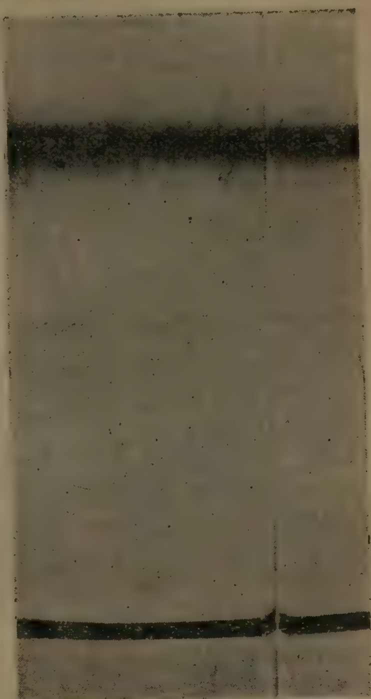


图 42 电解质濃度对脱氧核糖核酸鈉沉降系数的影响

超清晰界区 (hypersharp boundary) 是脱氧戊糖核酸鈉沉降行为的一个显著特征。在不大变性的样品中,其濃度約在 1×10^{-4} g/ml 以上时,不論有电解质加入或沒有电解质加入,均一定能找到这样的界区[10,16]。但是在氯化鎂溶液中的界区不象在氯化鈉或氯化鉀溶液中的那样清晰[11]。脱氧戊糖核酸鈉的一个典型的超清晰界区見照片 4。在早些时候已經証实过,沉降界区的清晰程度并不表示沉降系数的均一性,因此亦不代表分子量的均一性。造成这样超清晰界区的原因一般均归因于沉降系数对濃度的明显的依賴关系(参看 Peacocke 和 Schachman[10] 的报道),因此界区是受自清晰效应(self-sharpening effect)的影响。但是,这种看法需要加以修改,因为 Coates 和 Jordan[15] 曾指出,在 $0.2M$ 氯化鈉溶液中在濃度 5 和 10×10^{-4} g/ml 之間[在这个溶液中它們的沉降系数是相似的(图 40)]所成的人为界区,其超清晰程度与在同溶剂中濃度在 0 和 5×10^{-4} g/ml 之間所成的界区是相

同的。假如沉降系数与濃度有关的假設是正确的，則可以預料到前者的界区应該显出正常的扩展，因为越过界区时的沉降系数只有很小的变化，而后者的界区应該是超清晰的。虽然对这种行为还沒有提出过比較滿意的解釋，但是 Coates 和 Jordan[15] 认为超清晰界区的形成与核酸盐离子所带的电荷对濃度的依賴关系有关。在濃度低于 10^{-4} g/ml 时，界区显示出明显的扩展。Shooter 和 Butler[16~18] 指出这是由于核酸样品的眞正的物理的不均一性所引起的，而不是由于界区的不稳定性所造成的。根据界区的形状可以計算出在无限稀釋时的沉降系数分布[17~19]。至于用去污剂法制备的样品，沉降系数是在 12 S 到約 40 S 之間（参看第三章，图 1 到 3，37 到 39 頁）。上面所提到的 29S 值是根据界区中心移动的速度計算出来的，因此可以代表重均分子量。



照片 4 典型的脱氧戊糖核酸鈉的超清晰沉降界区

J. H. Coates 和 D. O. Jordan: *Biochem. biophys. Acta* 1959, **35**, 309 頁

沉降系数对濃度的依賴关系似乎是随着核酸的本质而改变的，因此也随着核酸的来源而改变。例如 *Salmonella enteritidis* 噬菌体 D4 的脱氧戊糖核酸鈉表現出这样显著的沉降系数对濃度依賴关系的改变，以致卽使測定是在濃度低至 1×10^{-5} g/ml 时进行，外推至无限稀釋仍不可能。Goodgal、Rupert 和 Herriot[21] 用分配液槽(partition cell)方法測定了在更低濃度，$10^{-5} \sim 10^{-7}$g/ml，溶液中的 *Haemophilus influenzae* 遺傳轉移物质的脱氧戊糖核酸

的沉降系数。在这个濃度范圍內所测得的沉降系数为 $27S \pm 2.5S$。

由于种种原因，测定脫氧戊糖核酸鈉的扩散系数是困难的。因为扩散系数对濃度具有显著的依赖关系，因此得到的是一个不对称的(歪斜的)界区[8]，而且还有一个界区的明显移动[22]。只有 Cecil 和 Ogston[6] 以及 Kahler[8] 对这种現象作了广泛的研究。前两个研究者在20°C的 $0.2M$ 氯化鈉溶液中所測得的在无限稀釋时的扩散系数为 8.1×10^{-8} 平方厘米/秒，而后一研究者在 20°C 的磷酸盐緩冲溶液(pH 7.4，离子强度 0.3)中所測得的在无限稀釋时的扩散系数則为 4.5×10^{-8} 平方厘米/秒。因为他們所用的溶剂的本质不同,因此要比較这些結果是有困难的。同时因为 Cecil 和 Ogston 用 Gouy 方法观察到扩散系数随着濃度的增加而减小，而 Kahler 用 Schlieren 方法則观察到扩散系数随着濃度的增加而增加，因而使这些結果的比較更加困难。后者的扩散系数对濃度的依赖关系被 Howard 所証实[23]。Coates[24] 曾企图用 Rayleigh 光学系統来測定扩散系数，但发現用平常所用的冲洗技术(flushing technique)使在开始时生成一个明显的界区是非常困难的，因为虽然很稀的脫氧戊糖核酸鈉的溶液仍具有很大粘度。虽然如此，在 25°C 时，濃度为 8×10^{-4}g/ml 而 pH 为 7.0 和离子强度为 0.2 的磷酸盐緩冲液中的扩散系数的大概数值 3×10^{-8} 平方厘米/秒仍有記載。这个数值与 James[25] 用以在 1×10^{-5}g/ml 濃度或更低濃度的溶液中測定而設計的方法来測定在水溶液中和在 $0.2M$ 氯化鈉溶液中的扩散系数所得的在无限稀釋时的数值 2×10^{-8} 平方厘米/秒相当符合。*Haemophilus influenzae* 遺傳轉移物质的脫氧戊糖核酸的扩散系数值亦曾經測定为 3×10^{-8} 平方厘米/秒[21]。因此，根据这些初步的研究，良好制品的扩散系数值似乎是在 $2\sim3\times10^{-8}$ 平方厘米/秒之間。应用 Svedberg 方程式，将扩散系数值 2×10^{-8} 与沉降系数值 $24S$ 代入,則得到的分子量的数值为 6×10^{6}。这个扩散系数值与沉降系数值都是从測定用酶促水解方法制备的小牛胸腺脫氧核糖核酸盐所得到的。至于用去污剂法制备的小牛胸腺脫氧核糖核酸盐，如将其扩散系数值 3×10^{-8} 和沉降系数值

$29S$ 代入方程式,则得到的分子量的数值为 5×10^6。

在取得扩散系数的可靠数值时所遇到的困难促使我們将沉降系数和其他数据合拌代入方程式以求得分子量数值。这个方法常涉及一个关于脱氧戊糖核酸盐离子形状和柔性的假定。最常用的方法是应用 Mandelkern、Krigbaum、Scheraga 和 Flory[4] 的方程式将沉降系数和特性粘数代入。特性粘数提供了有关溶液中分子大小的知識;当以 c. g. s. 单位表示时,大致可代表分子的有效体积。从小牛胸腺脱氧核糖核酸鈉在剪应力近于零时所得到的特性粘数,不同的研究者得到的数值具有較大范圍的差异。Pouyet[26]、Conway 和 Butler[27],Jordan 和 Porter[28],Reichmann、Rice、Thomas 和 Doty[29] 以及 Eisenberg[30] 等得到的数值都在 $5.0\sim5.5\times10^3$ c. g. s. 单位之間,而 Butler、Laurence、Robins 和 Shooter[2] 对这种核酸盐的六个不同样品所测得的数值在 $2.9\sim5.0\times10^3$ 之間(参看表 14, 194 頁),其最大与最小的数值几乎相差二倍。Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[31] 对不同的制品所测得的数值为 $3.4\sim5.7\times10^3$,而 Doty、McGill 和 Rice[12] 对用光散射法测定其分子量为 7.4×10^6 的脱氧核糖核酸盐所测得的数值为 6.9×10^3。后者的研究者还从超声波碎片的研究結果指出关系式

$$[\eta]=1.45\times10^{-4}M^{1.12}$$

对分子量在 3×10^5 与 7.4×10^6 之間的眞正同系物仍可适用。

为了要应用 Mandelkern、Krigbaum、Scheraga 和 Flory[14] 的方程式,需要对核酸盐离子在溶液中的形状作一个假定。这个方程式可写成如下式:

$$M^{2/3}=\frac{S^0[\eta]^{1/3}}{\beta}\cdot\frac{\eta_0 N}{(1-V_p)}$$

式中 β 值从分子軸比为 1 的 2.12×10^6 改变为統計卷曲(statistical coil) 分子的 2.6×10^6 和极大軸比的剛性棒状分子的 3.6×10^6。Barbu、Joly、Robins 和 Shooter[20] 从几个不同天然脱氧戊糖核酸盐样品的 S° 与 $[\eta]^{1/3}$ 之間的关系为綫性的証据,曾証明这个方程式对脱氧戊糖核酸亦可应用。但是,Doty、McGill 和 Rice[12] 用

β 值从分子量为 3×10^5 时的 2.56 到分子量为 8×10^6 时的 3.29 的改变来解释他們对不同超声波碎片同系物所测的粘度、沉降系数和光散射的結果,因此指出了軸比是随着分子量而改变的。虽然如此,应用这个方程式以計算大部分的分子量时都采用 2.6×10^6 作为 β 值,这个 β 值是假定核酸盐离子是保持統計卷曲的。但是核酸盐离子是否一定会具有如此足够柔軟的程度以致可以采用这个构型是非常可疑的,而这个方程式在核酸方面的应用不能认为是一个完全严格的方法。应用这个方程式計算而得的不同样品的分子量数值是在 $6\sim12\times10^6$ 之間[2,10,32,33](参看表 11)。最广泛的結果是 Butler、Laurence、Robins 和 Shooter[2] 研究所得到的,其数值范圍較狹,在 $8.5\sim10\times10^6$ 之間。Mathieson 和 Porter[32] 应用从濃溶液中所得到的粘度和定向角度(从流动双折射测得的)的数据代入 Peterlin[34] 方程式亦計算出分子量。这样算出的分子量不是 1.5×10^6 就是 4.5×10^6,这与假定核酸盐大分子离子是剛性的抑或是柔軟的有关。用这些方法所测得的分子量数值摘录在表 11 中。

但是脱氧戊糖核酸鈉不同制品的分子量的最广泛数据是从溶液的光散射测定得到的。带有电荷的聚合物所产生的光散射与大分子离子間的静电斥力有关,它影响到散射光的强度和角度的分布。但是,当外推到无限稀釋和对加有电解质的溶液进行测定时,由于聚合物上带有电荷所造成的解釋上的困难大部分都能够被克服。Doty 和 Bunce[36] 对脱氧戊糖核酸鈉溶液的光散射测定的准确度估計在 ±12%,而 Sadron、Pouyet 和 Vendrely[37] 的估計則为 ±15%。Doty 和 Sadron 及其同工者曾将 Oster[38] 的以及 Smith 和 Sheffer[39] 的早期研究工作大大地加以发展,并将小牛胸腺以及其他組織中的脱氧戊糖核酸鈉的不同制品所测得的結果摘录在表 12 和 13 中。表 12 中括号內的三个数值是由 Doty 和 Bunce[36] 应用 Tennet 和 Vilbrandt[5] 所测得的比折射率的增加值 0.160 計算出来的;其后 Reichmann、Rice、Thomas 和 Doty[29] 又对一个更好的核酸制品测定其比折射率的增加值,其数值为 0.188。他們

表 11　从沉降系数(S)、扩散系数(D)和特性粘数[η]测定的脱氧戊糖核酸鈉不同样品的分子量

来　源	制备方法	测定方法	$M\times10^{-6}$	参考文献
小牛胸腺	酶促水解法	$S°$ 及 $D°$	6	16～19,25
小牛胸腺	去污剂法②	$S°$ 及 D^*	5	14,17,24
Haemophilus influenzae	未注明	$S°$ 及 $D°$	15	21
小牛胸腺	Signer 法③	$S°$ 及 [η]	8.5	10
小牛胸腺	酶促水解法①	$S°$ 及 [η]	6.6;10.5	33
小牛胸腺	去污剂法②	$S°$ 及 [η]	9.4;11.6	33
小牛胸腺	氯仿法④	$S°$ 及 [η]	2.2	32
小牛胸腺	未注明	$S°$ 及 [η]	{8.5;9.0;9.5; 10.0;10.8}	33
Salmonella enteritidis 噬菌体 D4	Wahl 法[35]	$S°$ 及 [η]	26	20

* 未外推到无限稀釋

① Butler, J. A. V., Conway, B. E. 和 James, D. W. F. *Trans. Faraday Soc.* 1954, **50**, 612 頁

② Kay, E. R. M., Simmons, N. S. 和 Dounce, A. L. *J. Amer. Chem. Soc.* 1952,**74**, 1724 頁

③ Signer, R. 和 Schwander, H. *Helv. chim. acta* 1949, **32**, 853 頁; Schwander, H. 和 Signer, R. *Helv. chim. acta* 1950, **33**, 1521 頁

④ Gulland, J. M., Jordan, D. O. 和 Threlfall, C. J. *J.chem. Soc.* 1947, 1129 頁

根据这个数值重新計算了 Doty 和 Bunce 的結果。似乎以后大部分的测定都采用 0.188 这个数値，虽然 Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[31] 曾应用了 0.191 的数值，而采用更高的数值 0.201 亦曾有所报道[54]。

除了分子量大于 11×10^6 的、以及用氯仿-凝胶法分离蛋白质和核酸后所得的分子量数值外，从小牛胸腺制得的脱氧核糖核酸盐的大部分分子量的其余数值大概都在 $5.8\sim7.7\times10^6$ 的范圍內[37,53]（見表 12）。从上面所提到的方法的准确度的估計，不能期望从这个方法（光散射法）所测得的分子量得到一个比較狭小的范圍。表 12 中所列的分子量的高数值約为低分子量数值的二倍[37]，因此曾臆断地认为这很可能是由于大分子聚集成二聚体的緣故[37]。但是，Butler、Laurence、Robins 和 Shooter[2] 曾指出在测

表 12 从光散射法测定的数种小牛胸腺脱氧核糖核酸鈉样品的分子量

制备方法和样品号碼	$M\times10^{-6}$	参考文献
氯仿法	4.4	39
氯仿法(Gulland 制备物)	(4.0), 3.5	(36), 29
Signer 法(SVII)	(6.7), 5.9	(36), 29
Signer 法(Doty 制备物)	(4.0), 3.5	(36), 29
Signer 法(Doty 制备物)	7.7	40, 41
去污剂法(SBI)	5.85	42, 29
去污剂法(SCI)	6.6	42
Signer 法(VI)	6.85	42, 29
去污剂法(SBII)	8.2	42
去污剂法(Dounce 制备物)	4.7	29
Chargaff 法①	4.65	29
Signer 法 (Brown 制备物)	6.0	43
氯仿法(Rowen 制备物)	4.5	44, 45
Signer 法(Katz 制备物)	8.0	46
Signer 法(CV49)	4.6	37,47～49
Signer 法(SVIII)	6.0	37,47～49
C. R. M.*(CV3)	1.9	49
Signer 法(CV42)	4.0	37,47～49
Signer 法(SV)	6.0	37,47～49
Signer 法(SXII)	11.6	49, 50
去污剂法(CV9)	15.0	37,47～49
Signer 法(CV5)	16.5	37,47～49
Signer 法(SX)	3.8	49, 50
Signer 法(I 69; CV69; CV71)	6.0	37, 48
Signer 法(CV62; CV64)	13.0	37, 48
Signer 法(I62)	14.0	37, 48
未注明	3.0, 3.3, 4.0,17	2
去污剂法	7.4	12
氯仿法	4.4, 7.3	58

* 法国 Strasbourg 地方的 Centre de Recherches sur les Macromolecules 研究室制备的,未注明确实的方法

① Chargaff, E. 和 Zamenhof, S. *J. biol. Chem.* 1948,**173**, 327 頁

定光散射前溶液的初步澄清的有效程度对溶液的濃度有极灵敏的影响。因此 0.1% 的溶液經 20000 g 轉离 18 小时后所得的分子

表 13　用光散射法測定不同来源的脱氧核糖核酸鈉的不同制品所得的分子量

来　源	制备方法	$M\times10^{-6}$	参考文献
大腸杆菌	去污剂法	7.0	51
Arbacia lixula	Chargaff 法①	2.3	43
大腸杆菌	Chargaff 法①	9.1	43
鳥型結核杆菌	Chargaff 法①	14.4	43
鲱魚精子	Signer 法	6.0	52
鲟魚精子	Mirsky 法	6.0	37,48
鸡紅血球	Signer 法(CV51)	11.6	37,48,49
鸡紅血球	Signer 法(CV78)	15.0	37,48
鸡紅血球	未注明	4.2	53
肺炎球菌	未注明	7.7	53

① Chargaff, E., Lipshitz, R. 和 Green, C. *J. biol. Chem.* 1952, **195**, 155 頁; Gandelman, B., Zamenhof, S. 和 Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **9**, 399 頁; Chargaff, E., Zamenhof, S., Brawerman, G. 和 Kerin, L. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**,3825 頁; Zamenhof, S., Brawerman, G. 和 Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **9**, 402 頁; Snellman, O. 和 Widström, G. *Arkiv. Kemi Min. Geol.*1945, **19A**, No. 31

量大于 20×10^6；但如用同样的核酸样品的 0.04% 的溶液进行澄清，则所得的分子量为 3×10^6。这种能够得到改进的澄清应归因于較稀的溶液有較小的粘性。使溶液变成非常混浊的物质曾被指出不是脱氧戊糖核酸，因此应該是眞正的杂质，并且这种杂质的存在并不影响样品的沉降系数和特性粘数。似乎应該先对样品的純度和溶液的制备方法进行詳細檢查才能对高分子量数值作任何考慮。

对同样样品用不同方法测得的分子量数值很少作过比較。但是这样的比較是必要的，进行时不但要适当地注意到某一特殊方法所产生的平均分子量的类型，而且还要注意到这个方法对分子形状所发生的改变的灵敏度以及在所用的方程式中的其他假定所指出的意义。将沉降系数和扩散系数合并代入方程式后所求得的平均分子量接近于 z–均分子量，但不等于 z–均分子量，而由沉降系数和特性粘数合并代入方程式后所求得的平均分子量接近于重均

分子量。一般来讲,用光散射法求得的分子量为重均分子量,但它多少与分子量的分布有关[55,56](参看下面)。

Butler、Laurence、Robins 和 Shooter[2] 曾对用光散射法以及从沉降系数和特性粘数方法所测得的分子量作一直接比較。这个比較亦可从 Doty、McGill 和 Rice[12] 对超声波碎片同系物所测得的数据来进行,其結果列在表 14 中。

表 14 用光散射法(M_L)以及用沉降系数和特性粘数($M_{S,\eta}$)测得的数种小牛胸腺脱氧核糖核酸鈉样品的分子量

样品編号	S_{20}° Svedberg 单位	$[\eta]\times10^{-3}$ c. g. s. 单位	$M_{S,\eta}\times10^{-6}$	$M_L\times10^{-6}$	参考文献
31 C	27	3.5	10.0	3.0	2
33	25	2.9	8.5	3.3	2
36	28	3.34	10.8	3.3	2
40	22	5.0	9.0	4.0	2
34	25	3.4	9.0	3.3	2
38	23	4.7	9.5	17	2
0*	22.0	6.9	10.4	7.4	12
1*	12.2	3.73	3.2	3.4	12
5*	9.0	0.535	7.6	7.0	12
20*	7.75	0.312	4.6	4.5	12
60*	6.9	0.177	2.9	3.0	12

* 用超声波处理的时間(分)

用这两种方法計算分子量所产生的差异是因为光散射的原理不适用于很长的棒状分子的分子量的計算，以及不均一性对这两种测定方法所产生的影响[2]。但是 Doty[56] 曾指出,在 Mandelkern、Krigbaum、Scheraga 和 Flory 方程式中不均一性系数在 M_w/M_n 从 1.5 改变到 5 的范圍內几乎保持不变。对脱氧戊糖核酸鈉溶液作光散射研究时常假定 M_z:M_w:M_n=3:2:1, 因为这样可以避免在很小的散射角处进行测定的需要；这种测定如果不是不可能的話,亦是非常困难的。Doty[56] 曾証明要使用光散射法測得的分子量数值提高到用粘度和沉降系数計算得到的数值，就需要有一个

M_w/M_n 大于 5 的极寬的分子量分布。虽然 Schachman[57] 曾估計 M_w/M_n 的比值为 3:1，但是这个比值还沒有用实驗測定过。間接的証据可以从酸对脫氧戊糖核酸盐离子形状的影响的研究而得到[29]。在酸性溶液中核酸盐离子的大小与在中性溶液中比較时减小很多，但是分子量并沒有改变。Doty 对这个結果的解釋认为是，表示 M_w/M_n 的比值不会离开 2 太远，而且肯定不会大于 5。

这两种計算分子量的方法間的差异很可能是由于在 Mandelkern、Krigbaum、Scheraga 和 Flory 方程式中所假定的流体力学模型与脫氧戊糖核酸盐离子流体力学模型的不同所造成的。显然需要进一步研究样品在无限稀釋时的不均一性以澄清这种情況，否則就必須对用化学方法或物理方法所得到的更精細的分級分离的級分进行研究。

很少采用过其他測定核酸分子量的方法，事实上其他方法也极少。但是，Fluke、Drew 和 Pollard[59] 用 2MeV 电子和 3.8MeV 氘轰击一个肺炎球菌的遺傳轉移物质的脫氧戊糖核酸样品后，分析其剩余的活力，曾測得其分子量为 6×10^6。Mathieson 和 Porter[32] 亦曾从特性粘数和旋轉扩散 (rotary diffusion) 常数的測定計算出小牛胸腺脫氧核糖核酸盐的分子量为 3×10^6。

总而言之，可以这样地說，有相当完善的証据表明，用光散射法測得的小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的良好制品的重均分子量是在 $6\sim8\times10^6$ 之間。制品之所以有較低的分子量可能是因为在制备过程中发生了降解。对其他組織中的脫氧戊糖核酸盐离子的分子量沒有进行过足够的測定，因此还不能得到同样的結論。肯定地还沒有足够的証据足以支持 Sadron、Pouyet 和 Vendrely[37] 所认为的、所有生物組織中的脫氧戊糖核酸都具有同样分子量的論点。这样的假設不但需要分子量应該是相同的証据，而且也需要分子量分布是相同的証据。需要再提一下，核酸的物理不均一性可能对遺傳具有眞正的意义(参看第三章)，而只有用物理或化学方法进行分級分离后所得的类似的級分的分子量才能加以比較。

溶液中脫氧戊糖核酸鈉的分子构型

現在所公认的 Watson-Crick 的脫氧戊糖核酸盐分子模型(参看第九章,170 頁)的大小表示,根据脫氧戊糖核酸鈉的晶体是A型抑或是B型,核苷酸間的距离不是 2.6 Å,就是 3.3 Å,而分子的直徑則为 18 Å。如果假定在溶液中 Watson-Crick 模型仍保持不变,并将脫氧戊糖核酸盐的分子量当作 7×10^6,則这个大分子离子的长度約为 30,000 Å。虽然当与合成的多聚电解质的剛性比較时,在双螺旋結构中核苷酸間的氫鍵能够大大地增加大分子离子的剛性,但从可能产生的极大軸比来看,这个大分子在溶液中不象会保持完全笔直和坚硬的[10,60]。

从許多不同的实驗技术,包括流动双折射、粘度和光散射以及比較少用的沉降等測定的应用,曾获得了脫氧戊糖核酸盐离子在中性溶液中的形状和大小的知識。这些測定結果的解釋可以分为两步。首先是測定大分子离子的一般形状,其次是在假定一个特种流体力学模型的基础上測定其大小。最通常假定的模型是剛性棒和統計卷曲。由于制品的不均一性未搞清楚以及随之而来的实驗数据的分析不能肯定,因此对結果的解釋也产生了困难。

Signer、Caspersson 和 Hammarsten[61] 首先从流动双折射和粘度的測定測得了溶液中脫氧戊糖核酸盐离子的軸比的数值为 300。Tennent 和 Vilbrandt[5],Cecil 和 Ogston[6] 以及 Kahler[8] 曾从扩散系数和沉降系数的測定求得了摩擦比 (frictional ratio),然后据此再按 Perrin[62] 方程式計算出軸比的数值。对不同制品所得的軸比数值分別为 120、170～400 和 284。軸比也可以从所得的沉降系数、特性粘数和分子量的知識应用 Mandelkern、Krigbaum、Scheraga 和 Flory 方程式[4](参看 189 頁)来計算。前面(189 頁)已經提到,上述方程式中的函数 β 是与軸比有关;Peacocke 和 Schachman[10] 应用 Scheraga 和 Mandelkern[4] 所編撰的 β 值数据表,曾得到相等于伸展的椭圓体的暫用的軸比值

300。如果眞实粒子是剛性的,而且是不滲透溶剂的,則这个軸比值和眞实粒子的軸比值相同。Mathieson 和 Matty[63] 应用計算剛性棒的 Simha 方程式[64]，曾从特性粘数計算出数值为 416 的軸比值。Goldstein 和 Reichmann[66] 从流动双折射测定所得到的旋轉扩散系数并应用 Perrin[65] 方程式計算出三种高分子量的制品的軸比，其数值从 354 ~ 755。上面所述的从含有氯化鈉(通常 0.2M)的中性溶液中所得的脫氧戊糖核酸鈉的軸比值都有不可忽視的錯誤，因为这个軸比值对所测定的实驗次数是非常敏感的。虽然从几种計算的方法所测得的数值都在几百这一数量級，但它們都受到了批評，即不是假定了一个剛性棒模型就是在計算时应用了干燥分子的分子体积。Reichmann、Rice、Thomas 和 Doty[29] 曾对这两个假定加以批評，因为剛性棒模型不能产生对脫氧戊糖核酸鈉所观察到的光散射軌迹(scattering envelope)，并且核酸盐离子在溶液中水化很强。这些作者认为比較可取的模型应該是包含有溶剂和核酸盐离子的、并被溶剂所固定的橢圓体，其所含溶剂的体积約为核酸盐离子的 10^3 倍。这样的一个能产生所观察到的旋轉扩散常数值的模型的軸比約为 10，这个数值要比上面所提到的要小得多。

核酸盐离子在溶液中的构型的大量数据是用光散射法的测定获得的。但是,解釋散射光分布角度的数据是不容易的,而且需要作关于溶液的不均一性和适宜的流体力学模型的本质的假定。Oster[67] 用剛性棒模型来解釋他的实驗結果，而 Smith 和 Sheffer[39] 认为用統計卷曲模型来解釋更能与他們所得到的数据相符合。Doty 和 Bunce[36] 則考虑到各种可能的模型，包括带少数支鏈的多核苷酸或交联的多核苷酸。Reichmann、Varin 和 Doty[41]，Reichmann、Rice、Thomas 和 Doty[29] 以及 Rowen[45] 等的比較深入的光散射研究的数据普遍地指出在溶液中的脫氧戊糖核酸盐离子的形状既不接近于剛性棒,也不接近于統計卷曲,而它的行为却在这两个极端之間。这种中間的构型 Rowen[45] 曾称之为略为柔軟的棒，而 Reichmann、Rice、Thomas 和 Doty[29] 則称

之为硬的卷曲。从下面的討論中似乎可以认为对核酸盐离子在溶液中的行为的后一个描述更为可靠。

在表 15[29,66] 中列出了三种高分子量聚合物制品分子的大小。均方半徑 (radius of gyration)，即大分子的每个片段的重量与其从重心处的距离的平方乘积之和，曾从用光散射数据所作的 Zimm 图中直接計算出来。这些数量值在表 15 中用 R_g 表示，而这三个样品的数量值均在 2000 Å 数量級。因此表示了这些离子的重量是非常大的，而且它們是高度伸展的。全部交互的散射軌迹 (complete reciprocal scattering envelope) (参看图 43) 的形状与散射的粒子的形状有关，而且也与分子量的分布(参看下面)有关，虽然其关系比較少。Reichmann、Rice、Thomas 和 Doty[29] 认为对簡单的流体力学模型来讲，与观察到的光散射軌迹最相一致的是一个自由卷曲。Eisenberg[30] 从稀溶液粘度测定的結果亦得到同样的結論。表 15 中的均方末端距(root-mean-square-end-to-end distance) $\sqrt{\overline{R^2}}$ 是以这个原理为根据，利用光散射的数据計算出来的。这个数量值是 z-均大小值，亦即相当于 z-均分子量的分子平均大小，这个数值比表 15 中所列的重均分子量要大些。

表 15 中的最后一行的末端平均距 $R_{[\eta]}$ 是从剪应力为零时的

表 15　小牛胸腺脱氧核糖核酸鈉制品的分子常数及分子大小

制备方法和样品編号	M $\times 10^{-6}$	$\sqrt{\overline{R^2}}$ Å	$\sqrt{\overline{R_g^2}}$ Å	L Å	θ sec^{-1}	$2a$ Å	$[\eta]\times 10^{-3}$ c.g.s. 单位	$R_{[\eta]}$ Å
Signer 法(SVIII)	5.90	5400	2200	28000	21.2	10900	5.1	5240
Signer 法(VI)	6.85	5030	2050	33000	4.64	19000	4.8	5400
去汚剂法(SBI)	5.85	4950	2020	28000	18.2	11200	5.34	5300

M＝光散射法测定的分子量
$\sqrt{\overline{R^2}}$＝光散射法测定的末端平均距
$\sqrt{\overline{R_g^2}}$＝均方半徑
L＝大分子外形的长度，假定每二个核苷酸为 3.3 Å
θ＝旋轉扩散系数
$2a$＝从 θ 所得的主軸长度
$[\eta]$＝在剪应力为零时的特性粘数
$R_{[\eta]}$＝用粘度法測得的末端平均距

(摘自 M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas 和 P. Doty: *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, 3048 頁)

特性粘数的数値,用 Flory 和 Fox 方程式[68]計算出来的[29]。这个方程式是以自由卷曲的流体力学模型为根据的，并且也假定分子量的分布范圍幷不大到足以引起显著的誤差。所得到的数値与用光散射法测得的$\sqrt{R^2}$相当符合。

在表 15 中亦列出了旋轉扩散系数以及从旋轉扩散系数所計算出来的主軸軸长。这些数値是由 Goldstein 和 Reichmann[66] 测定脫氧核糖核酸鈉溶液的流动双折射而得到的，他們把分子体积假定为干分子的体积。Schwander 和 Cerf[69] 起先亦曾作过同样的計算。他們所得到的旋轉扩散系数为 36.6 秒$^{-1}$。Schwander[70] 假定分子的直徑为 10 Å，从这个旋轉扩散系数計算出主軸的軸长为 8000 Å。Mathieson 和 Matty[63] 假定分子为剛性棒模型，亦曾从旋轉扩散系数和特性粘数計算出主軸軸长的数値为 9360 Å。虽然可以預料到 Goldstein 和 Reichmann 所得到的半主軸軸长 a 的数値 (表 15) 与$\sqrt{R^2}$的数値非常接近，因为这两个数量値都与均方半徑有同样的关系，但是这两个軸长的符合被认为是偶然的[29]，因为在这两个計算中所假定的流体力学模型是不同的。半主軸的軸长是在假定分子为剛性棒(具有很大軸比的橢圓体)的情况下計算出来的，而$\sqrt{R^2}$是根据分子为自由卷曲計算出来的。

象已經指出的，全部交互的散射軌迹形状非常接近于自由卷曲的散射軌迹形状，但不与之完全相同。但是，交互散射軌迹曲綫的向下弯曲 (图 43) 可由自由卷曲分子的大小和分子量的过分不均一性所引起，或由具有狹窄的分子量分布的自由卷曲分子的剛性所引起。如果試图用寬的分子量分布范圍来解釋这个偏差,則需要非常高的数値 $M_z/M_w=2$ 和 $M_w/M_n=6$ 来描述这个不均一性[29]。如果假定有比較小的分子量分布范圍存在，象 $M_w/M_n=2$, 則可以計算出有半数以上的粒子太硬,以致不能折迭成自由卷曲的形状。

曾有人企图在理論上来处理这个剛性卷曲的問題。Peterlin[71~73] 曾发展了一个理論，认为分子的形状与卷曲的剛性关系可用一个参数，即所謂的‘长度不变’或‘Porod’单位 (persistance

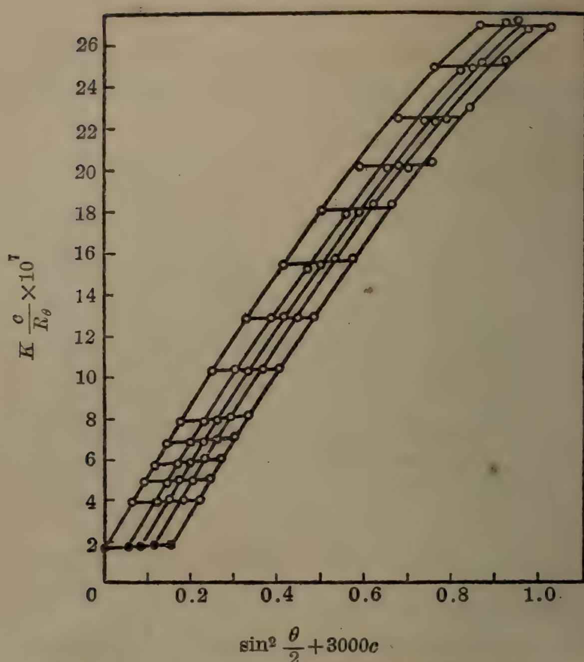


图 43 在 0.2*M* 氯化鈉溶液中的脱氧核糖核酸的光散射数据
(M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas 和 P. Doty: *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, 3050 頁)

length 或 'Porod' unit)来說明。这个'Porod'单位是在一根无限长的綫的一端切綫(tangent)处的投影的平均值。在采用了 Kratky 和 Porod[74] 的'蚯蚓状'鏈模型后，Peterlin 成功地将交互的散射軌迹中的曲綫向下弯曲的程度与代表大分子离子的'Porod'单位的数目和长度联系起来。而且在一个已知分子量(M_z)的样品的'Porod'单位的数目已經測定后，每单位长度的重量 M/L 即可加以測定。Peterlin[73] 和 Doty[56] 曾根据这个理論分析了光散射的数据。Doty 应用了 Rice 和 Doty[42] 的实驗結果后曾指出，若用 100 的数值作为核酸盐离子的'Porod'单位的数值，光散射軌迹图可以与从 Peterlin 的理論所計算出来的曲綫紧密地接近起来。此时所得的'Porod'单位长度为 500 Å，这就使得

M/L 的每个 Å 为 230 分子量单位。这个数值可以很便利地与 Watson-Crick 模型所需要的数值 200 相比較，并且可以支持这样的論点，即在交互軌迹图中所观察到的弯曲是由具有狭窄分子量分布的鏈与高度扩張的鏈所引起，而不是由极度广闊分子量分布所引起的。‘Porod’ 单位的长度 500 Å 表示分子的卷曲是非常少的，这与剛性自由卷曲的模型相符合。

与溶液中脱氧戊糖核酸盐离子的精确流体力学模型有很大关系的問題是离子的柔性。人所熟知，改变离子的环境可以使溶液中的自由卷曲的合成的多聚电解质分子的形状发生显著的改变。如果脱氧戊糖核酸盐离子的性质类似柔性的鏈，則可以完全預料到同样的形状改变（象在粘度、流动双折射和光散射的测定中所揭示的）会在改变溶液中的离子环境时产生。但是，如果在溶液中仍存在有以氫鍵連接的双螺旋結构，則与合成的多聚离子或单独的多核苷酸鏈相比时，亦可以預料到，在溶液中的核酸盐大分子离子会出現极大的硬化。

无外加电解质的脱氧戊糖核酸鈉溶液的粘度和流动双折射的测定不能加以重复（参看 Sadron[75] 的报告）。这种重复性缺乏的原因是由于核酸盐离子的变性（参看第十一章）。这种变性因温度的增高而加快，但也能因电解质的存在而受到阻碍或抑制。但是，最近 Kurucsev[76] 将粘度-时間的曲綫外推到时間为零时，能够重复地得到极稀的脱氧戊糖核酸鈉水溶液的起始时的粘度值。这些粘度值是指变性的核酸盐离子的粘度值，而不是指天然的、未变性的核酸盐离子的粘度值。因为在沒有电解质存在的溶液中进行各种测定有一定的困難，因此常将在极稀的氯化鈉溶液（大約 $4\times10^{-4}M$）中的溶液性质与在較濃电解质溶液中的溶液性质加以比較。中性的脱氧戊糖核酸鈉在水中或在稀电解质溶液中的粘度非常高，而且表現出与剪力的速率有很大的关系（非牛頓粘度）。如果将电解质加入到溶液中，則会使粘度显著下降[77~80]，这种显著下降最初被解釋[79] 为是由于脱氧戊糖核酸盐的可逆解聚所引起的。但是，用酸-碱滴定在水中和在 $1M$ 电解质溶液中的核酸盐

的結果[81] 表示,沒有酸性和碱性基团釋出，同时也表示以氫鍵連接的結构未遭到破坏。幷且光散射研究的結果亦指出增加离子强度幷不影响分子量，但只改变核酸盐离子的形状[29]。因此用解聚的解釋是不能成立的。Jordan[82] 遵循某些多聚电解质溶液的相似性，将这个粘度的下降归因于在加入氯化鈉时使大分子离子的不对称性减低。但是，在剪力为零时的特性粘数指出，特性粘数随离子强度所发生的变化很小(見下面)，这一結果使 Conway 和 Butler[27,83] 以及 Butler、Conway 和 James[84] 断定脫氧戊糖核酸鈉在水中的高粘度主要是由于分子間靜电作用所引起的。因而加入电解质时的粘度显著下降是由于这种相互作用减弱的緣故。

一些研究工作者测定了离子强度对特性粘数的影响，这个特性粘数是从剪力为零时所測得的粘度計算出来的，但所得的結果有些矛盾。Pouyet[26]，Conway 和 Butler[27]，Butler、Conway 和 James[84] 以及 Eisenberg[30] 根据他們測定的結果，断定 η_{sp}/c 对在不同电解质濃度中核酸盐溶液的濃度所作的曲綫可以外推至与特性粘数在濃度为零时的相同数值。根据这个結果，这些研究工作者断定特性粘数与电解质濃度无关；因此脫氧戊糖核酸盐离子不是柔軟的，而是剛硬的。但是，Jordan 和 Porter[28,85] 与 Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[31] 等在稍低濃度的溶液中所作的詳細研究指出，特性粘数和氯化鈉濃度之間有一定的变化关系。Jordan 和 Porter 的实驗数据見图 44。因此这些結果指出，核酸盐离子的大小是受电解质濃度的影响而有輕微的改变，因而具有一定程度的柔性。Jordan 和 Porter[85]从核酸盐离子在 $4\times10^{-4}M$ 和 $10^{-1}M$ 氯化鈉溶液中的特性粘数值計算出在这两种溶液中的核酸盐离子长度的比例；在应用 Flory-Fox[68] 方程式进行計算时，他們假定核酸盐离子是自由卷曲的模型，在应用 Simha[64] 方程式計算时，他們假定核酸盐离子是剛性棒模型。計算所得的結果列在表 16。这些結果指出，当氯化鈉的濃度从 $4\times10^{-4}M$ 增加到 $4\times10^{-1}M$ 时，核酸盐离子的长度收縮到原来长度的四分之三左右。这些結果与 Geiduschek[86] 及 Rowen[45] 用光散射法所測得的

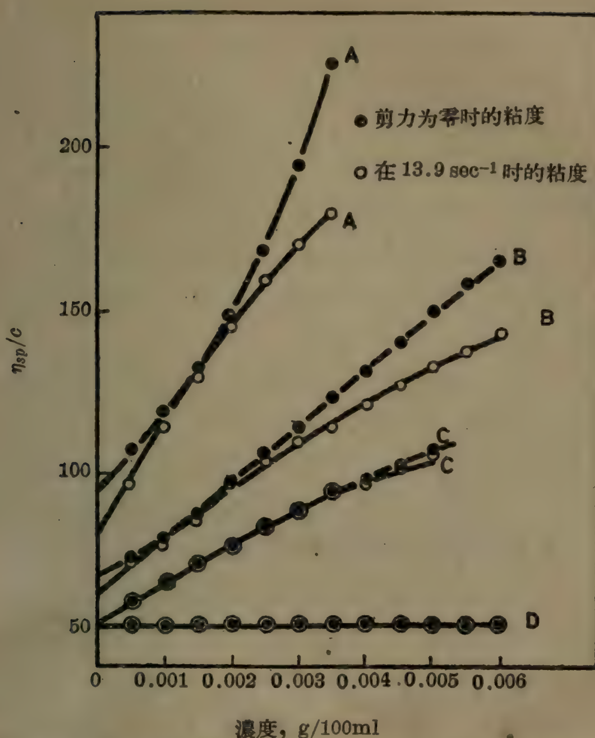


图 44 在不同濃度的氯化鈉溶液中特性粘数随脫氧戊糖核酸鈉濃度的变化[85]

A. $4\times10^{-4}M$ 氯化鈉溶液； B. $1\times10^{-3}M$ 氯化鈉溶液；
C. $4\times10^{-3}M$ 氯化鈉溶液； D. $1\times10^{-1}M$ 氯化鈉溶液

表 16 在不同濃度的溶液中的脫氧戊糖核酸盐离子的长度比[85]

計 算 方 法	計算比值时的濃度	比 值
Flory-Fox 法(自由卷曲)	$4\times10^{-4}M$ 和 $10^{-1}M$ NaCl	0.82
Simha 法(剛性棒)	$4\times10^{-4}M$ 和 $10^{-1}M$ NaCl	0.72
光散射法[45]	0 和 $2\times10^{-1}M$ NaCl	0.66

結果相符合。因此，Rowen 观察到当氯化鈉的濃度从零增加* 到 $2\times10^{-2}\,M$ 时，核酸盐离子的最大长度从 6800 Å 下降到 4500 Å，而 Geiduschek 則观察到当氯化鈉的濃度从 0.2 M 减到零时，核酸盐离子的最大长度則增加約 60%。同样的溶剂变更可以使典型的多聚电解质聚甲基丙烯酸鈉(sodium polymethacrylate)的长度改变 10 倍[87,88]。虽然因为脫氧戊糖核酸盐离子在溶液中产生一定程度的离子間的排斥[52]而引起在低离子强度溶液中的光散射測定的一些誤差，但是这許多測定方法仍有足够的一致性使人們肯定核酸盐离子是有一些变形的。

从流动双折射的研究亦得到关于脫氧戊糖核酸盐离子具有柔性的进一步知識[32,69,70,89~92]。Schwander 和 Cerf[69] 观察到虽然旋轉扩散常数保持不变，流动双折射仍随着离子强度的改变而降低。Sadron[75] 用剛性棒模型来解釋这个实驗結果。Schwander 和 Cerf[90] 測定脫氧戊糖核酸鈉溶液的双折射的实驗可能具有較重要的意义，被測定的脫氧戊糖核酸鈉溶液的粘度是由加入甘油加以調节的。溶液的流动双折射可以由剛性粒子在流动溶液的流动綫(stream line)上定向排列所引起；或由柔性的自由卷曲分子变形后使不对称性增加，然后再在溶液的流动綫上产生定向排列所引起；或者由这两个效应的綜合結果所引起。这两种效应对流动双折射的作用可以用改变溶剂粘度的方法来測定[93]。当增加溶剂的粘度时，$\tan\alpha$(α 是入射角 [extinction angle] 和速度梯度关系曲綫的起始斜率)与溶剂粘度应成直綫关系。对剛性棒来讲，与 $\tan\alpha$ 和粘度有关的直綫应通过原点；对柔性粒子来讲，則曲綫应有一个肯定的交叉点。Schwander 和 Cerf[90] 的实驗結果(图 45)以及 Horn、Leray、Pouyet 和 Sadron[94] 的实驗結果起初被解釋[75,90] 为是表示核酸盐离子在溶液中具有剛性棒的性质，而在粘度大的溶剂中所发生的对直綫的偏离則应归因于热效应。但是，Cerf[94] 根据更广泛的理論处理对这些实驗結果重新作了解釋，认为这个偏离是由核酸盐离子变形所产生的一种眞正結果。

* 原文誤写为减少(譯者注)

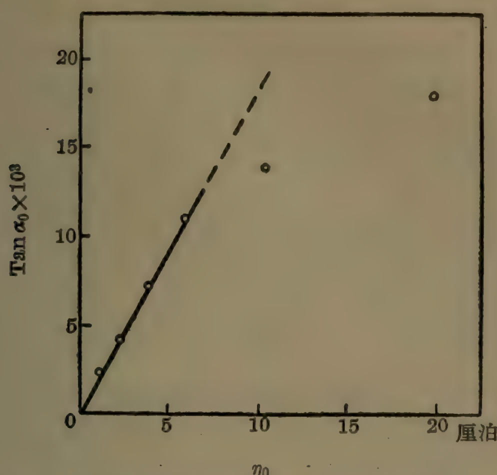


图 45　用甘油調节粘度的脫氧戊糖核酸鈉溶液的 tan α_0 值
(H. Schwander 和 R. Cerf: *Helv. chim. Acta* 1951, **31**, 441 頁)

根据上面的討論可以断定和实驗观察的結果最相符合的模型为硬的卷曲模型。这个卷曲模型具有一些柔性，并且当溶液中的离子强度增加时則稍为收縮，这是因为分子間离子排斥力减低的緣故。将酸和碱对脫氧戊糖核酸分子的形状和大小的影响与变性現象一起討論更为适当(参看第十一章)，但在这里需要注意的是用酸处理天然脫氧戊糖核酸所得的沒有氫鍵連接的自由卷曲分子是比較柔軟的，而且它的性质与天然核酸相比較时更接近于自由卷曲的多聚电解质。这个观察与上面所述的其他結果一起都証实了溶液中的脫氧戊糖核酸盐的 Watson-Crick 分子模型在电解质溶液中并沒有显著改变的結論。

从电子显微鏡研究所得的脫氧戊糖核酸分子的大小、形状和不均一性

电子显微鏡現在已能够很清楚地分辨出小粒子到 10 Å 的大小，这个大小的分辨能力已足够观察核酸分子大小的粒子，因此利

用电子显微鏡观察的方法作为用物理化学方法来研究在溶液中的分子大小和形状的間接研究的补助方法具有很大价值。不幸得很，技术上的困难阻碍了这个方法的使用，其中最严重的是将留在底物上的有机物小粒子与底物加以区别。虽然如此，最近所引用的一些新技术使这个方法能够在脫氧戊糖核酸上的应用得到一些重要的結果。在解釋这种实驗方法的結果时，特别是在說明分子大小时，必須記住所观察到的粒子是干的粒子。

Scott[95] 首先应用了电子显微鏡来研究脫氧戊糖核酸鈉。他得到了脫氧戊糖核酸鈉的长纤維照片。这个照片显示出纤維的长度和闊度差别很大，因此显然分子发生了側面的和纵的集聚。Barley[96] 得到了放大倍数較高的照片，但观察到一个直徑約为 100 Å 的圓球的多分散系統。Williams[98] 应用噴雾干燥和冰冻干燥的新技术将脫氧戊糖核酸鈉水溶液噴射在具有火棉胶薄膜的銅表面上[97]，得到了直徑为 15 Å 的脫氧戊糖核酸鈉纤維照片。这些纤維是相互联接着的，因此表明在原来的溶液中有网状結构的凝胶存在。Williams[99]亦能从长度的測定估計出 $M_w/M_n=1.6$，这証实了 Doty 所假定的狹窄的分子量分布。Rowen、Eden 和 Kahler[44] 曾报道了相似的纤維闊度。他們也断定纤維状分子是略为糾結的，因而不是不柔軟的。Schuster、Schramm 和 Zillig[100] 所得到的电子显微照片显示出纤維网状結构与 Williams 所观察到的相似。

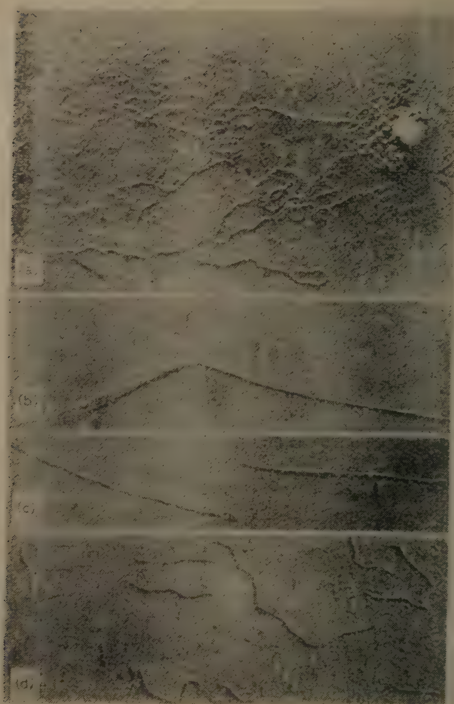
Hall[101,102] 曾介紹一种应用电子显微鏡观察大分子的新技术，这种技术应用在核酸上非常有效。进行操作时先应选擇剛切开的云母片作为底物来支持大分子，因为它对原子大小是均匀合适的，同时也因为它具有很大的亲水性质。再将脫氧戊糖核酸鈉溶液用市售的吹气噴雾器噴洒在云母片表面上，同时用白金作投影片(shadow-cast)，再垂直地沉积一层一氧化硅的薄膜以衬托白金。最后将乙酸戊酯的火棉胶溶液流过云母片表面并加以干燥。将所得的干燥薄膜划成若干方块。当将云母片放在水槽中时，方块即浮起，幷可从水中用平常的格子将其捺出。从測定的結果所得到

的分子直徑数值为 25±5 Å，这个数值与用結晶学方法测定的数值相符合。在某些脱氧戊糖核酸鈉濃度比較大的区域中，纤維(通常是几个分子寬的)常形成凝胶状态的网状結构。

Hall 和 Litt[103] 应用同样的操作技术对脱氧戊糖核酸作了更詳細的研究。他們特别注意的是在制备用作电子显微摄影的样品时防止样品变性。他們証实了分子的直徑約为 20 Å，但更重要的是分子游离末端的发現。天然脱氧戊糖核酸分子的末端是方的，这說明双螺旋結构一直維持到每个分子的末端〔照片 5(a)〕。但是，当双螺旋在两端脱开时，单股的多核苷酸鏈趋向于形成卷曲，而不是扯破成为两条明显解开的股。

照片 5(c) 表示出与照片 5(a) 同一物质所得到的两个脱氧戊糖核酸分子，但是分子的长度要比平均长度短得多。在这些粒子中，有兴趣的主要特征是具有 Hall 和 Litt 所描述的'結'(nodule)，这些'結'他們认为是分子末端部分变性的結果。这种类型的'結'很少在分子中部找到；当被找到时，几乎总是在分子末端。这可能表示双螺旋結构的解开一般是从末端开始，然后沿着分子主軸向內部解开。这个研究結果进一步証实了脱氧戊糖核酸分子与 Dekker 和 Schachman[104] 所建議的間断的二条股模型(参看第九章)相比时，是一个連續单股模型。照片 5(d)表示出經过用超声波降解后的脱氧戊糖核酸碎片。从特性粘数所测得的这些碎片的重均分子量为 9.7×10^5 (接近于一个重均单位)，而从电子显微摄影所得到的数均分子量和重均分子量分别为 4.2×10^5 和 7×10^5 [105]，这里假定分子重量对长度之比为 200。从照片中可以看出粒子是整齐地断裂，而且并不显示出任何与局部变性有关的'結'。这个观察証实了 Doty、McGill 和 Rice[12] 所认为的超声波碎片是眞正的同系物，并且仍然保留有天然脱氧戊糖核酸双螺旋的結构。当这些粒子不互相干扰时，其形状通常是相当直的，但当挤在一起时会变成曲折。因此又証实了脱氧戊糖核酸分子略为柔軟的結論。

自从不大容易找到未降解分子的两端以来，还沒有人研究过



照片 5　鮭魚精子脫氧戊糖核酸鈉的电子显微摄影.

(×*ca.* 100,000)(重制时縮小到 $\frac{2}{3}$)

(a) 在相当高的濃度中；(b) 两个分支分子的一部分；(c) 显出两端增厚同时部分变性的两个分子；(d) 經超声波作用后的碎片分子

(C. E. Hall 和 M. Litt: *J. biophys. biochem. Cytol.* 1958, **4**, 照片 7, 图 1, 2, 3 和 4)

天然脫氧核糖核酸分子长度的分布，因为測定許多分子的长度在技术上有困难。但是，Hall 和 Doty[105] 曾研究了脫氧戊糖核酸盐超声波碎片的数量分布情况。根据大約 700 个分子的长度測定所得的数量分布情况表示在图 46。长度不到 400 Å 的粒子并沒有包括在总数內，因为不能肯定这些小粒子究竟是核酸还是外来的物质。分布中的重均长度是 3500 Å。这个重均长度根据分子重量对长度之比为 200 的假定产生了重均分子量(指上面的)

7×10^5。所得的数均长度为 2100 Å，其数均分子量为 4.2×10^5。这就得到了 M_w/M_n 为 1.7 的数值，这与 Williams[99] 所得的天然核酸的数值极相符合。

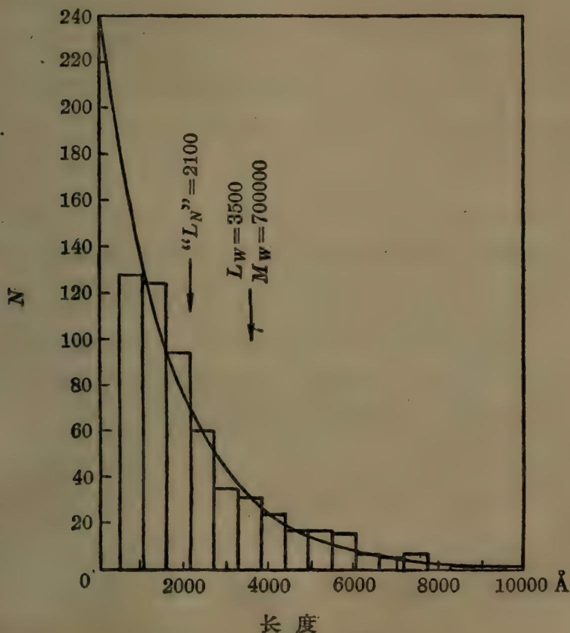


图 46 与最大可能分布相比的脱氧核糖核酸盐超声碎片的数目和分布。全曲綫代表最大可能的分布；实驗长度数据是从电子显微摄影得到的

(C. E. Hall 和 P. Doty: *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, 1272 頁)

脱氧戊糖核酸的酸碱性质

利用电位滴定方法来滴定酸碱基团以測定脱氧戊糖核酸的結构已在第九章中討論过。本章将討論在不同离子强度下的天然的和变性的脱氧戊糖核酸的酸碱基团的解离常数。不同基团在特定 pH 范圍內的解离本质可以用相同于測定单核苷酸的解离基团的方法来測定(参看第七章)。一級磷酸基团的 pK'_a 接近于1。胞嘧啶、

腺嘌呤和鳥嘌呤的氨基在pH 2～6的范圍内滴定,而—NH—CO—基团則在 pH 8～11 之間解离。

脫氧戊糖核酸解离性质的最显著特征是滴定曲綫的不可逆性，这些曲綫是从原来在 pH 6～7 的脫氧戊糖核酸鈉溶液先滴定到 pH 2.5 或 pH 12 时所得到的。将酸性或碱性溶液分别用碱或酸进行逆向滴定所得到的滴定曲綫与原来的正向滴定曲綫有显著的不同(参看图 36，第 172 頁)。

这个解离性质是 Gulland、Jordan 和 Taylor[81] 首先从小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉的滴定中所观察到的，并且对这个核酸以及对其他来源的脫氧戊糖核酸盐的这种解离性质加以肯定[77,106,107]。Gulland、Jordan 和 Taylor 原先所得到的滴定曲綫与逆向滴定曲綫完全符合，卽从 pH 12 的滴定与从 pH 2.5 的滴定相一致。这个一致性可能是偶然的，因为近来用連續滴定方法以及用相同方法制备核酸盐溶液来进行研究时并不是常常能証实这个一致性的[107,108]。缺乏一致性的原因曾被认为是由于核酸盐在干燥过程中輕微的先期水解[109]（用五氧化二磷在 110°C 下进行眞空干燥[81,106,108]），致使核苷酸間的鏈在 pH 10[107] 以上的連續滴定过程中的碱水解变得緩慢，以及由于在中和时重新局部形成具有氫鍵連接的結构所致[63]。但是，Cox 和 Peacocke[110,111] 曾用不連續的滴定方法[112] 在沒有液相接触的液槽中[112]，并严格控制其离子强度和大大减少在高 pH 时的停留时間，对鲱魚精子脫氧戊糖核酸鈉进行了詳細的研究,其結果見图 39 (第 175 頁)。图中曲綫的每一个点都代表着个别混合物的几次測定的結果。在氨基或—NH—CO—基团电离以后所得到的逆向滴定点是在同一曲綫上，而且是完全可逆的。因此逆向滴定曲綫的缺乏一致性可以认为是由于連續滴定法所带来的誤差。

Gulland、Jordan 和 Taylor[81] 用多核苷酸鏈間的氫鍵来解釋正向滴定曲綫与逆向滴定曲綫間的差异，所得的見解与 Watson-Crick 的分子模型完全一致(参看第九章)。逆向滴定曲綫的一致性表明,除在不同鏈上的基团間的氫鍵外,不能有其他不稳定的鍵

与氨基和—NH—CO—基团相連接。并且 Cox 和 Peacocke[110,111] 所得的滴定曲綫也指出沒有发現可覺察的二級磷酸解离，因此約每 20 个核苷酸存在有一个具有末端二級磷酸基团的不連續的分子模型[81,104]的可能性被排除了。

多聚酸的滴定性质研究指出，由于在滴定时更多基团的电离引起了多聚物上电荷的改变，因此一个基团的有效滴定常数亦随之改变，所以常用的解离方程式

$$pH = pK' - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right)$$

应由加入与核酸盐离子电荷和溶液的离子强度有关的項来加以校正。方程式中的 α 为解离度，pK′ 为滴定常数。Katchalsky、Shavit 和 Eisenberg[113] 曾指出，多聚电解质的解离可用下式表示：

$$pH = pK_0 - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) + \frac{0.4343e\Psi}{kT}$$

式中 e 为电荷数，k 为 Boltzmann 常数，Ψ 为静电位。Mathieson 和 Matty[63] 应用了表 17 中 Mathieson 和 McLaren[114] 所測得的 Ψ 值后曾指出这个方程式可以很滿意地用以解釋在一定濃度和离子强度下的解离常数值 (pK′) 偏离于 pK_0 (参看下面) 的現象。并且，静电位(Ψ)随着 pH 的改变是很小的，例如，在 $I=0.10$ 时，$0.4343\,e\Psi/kT$ 項的数値在 pH 3～6 时只增加 0.34 个 pH 单位 (参看表 17)。由此可以推知对脱氧戊糖核酸来讲这一項是沒有多大意义的，并且把核酸的滴定曲綫与自由的核苷酸或核苷的滴定曲綫相比較时，只有极小的伸展；这与合成的高分子电解质的滴定

表 17 脱氧核糖核酸盐离子的静电位 ($I=0.10$)

	pH					
	3.0	3.5	4.5	5.0	6.0	7.0
$\Psi\times10^4$	2.23	2.35	2.47	2.56	2.90	3.20
$0.4343e\Psi/kT$	1.14	1.20	1.26	1.30	1.48	1.63

(A. R. Mathieson 和 J. V. McLaren: *J. chem. Soc.* 1956, 306 頁)

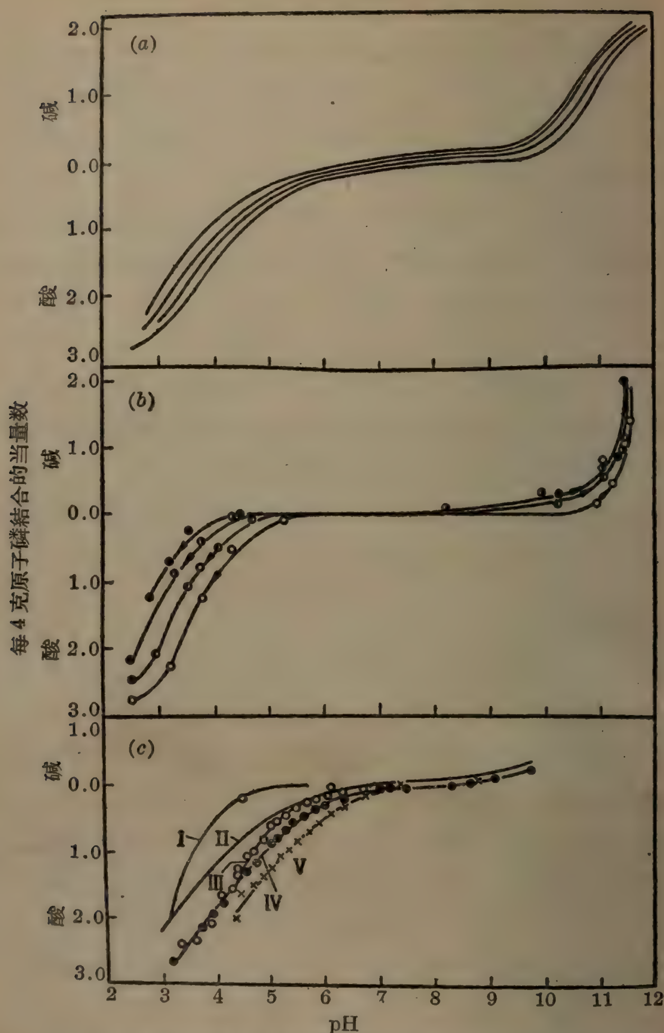


图 47 离子强度对脫氧戊糖核酸鈉的不可逆的正向滴定曲綫和可逆的逆向滴定曲綫的影响

(*a*) 可逆的逆向滴定曲綫。(*b*) 在不同离子强度时的正向滴定曲綫(I=0.02、0.05、0.15、0.50 从左边向右边讀)。(*c*) 在低离子强度时的酸滴定曲綫：I. 滴定到 pH 2.5 的正向滴定曲綫；II. 从 pH 2.5 开始的逆向滴定曲綫(I=0.05)；III. 不加入电解质时滴定到 pH 2.5 的正向滴定曲綫(○)；IV. 不加入电解质时从 pH 2.5 开始的逆向滴定曲綫(●)(I≤0.007)；V. 用酸預先处理过的并經过中和和透析的脫氧戊糖核酸盐用酸滴定的可逆滴定曲綫(×)

(R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. chem. Soc.* 1956, 2503 頁)

行为与单体比較时恰成一个明显的对照。 Peacocke 和 Lifson[115] 将脱氧戊糖核酸的这种性质归因于一級磷酸基团的占优势的影响，这些基团在 pH 大于約 2.5 时完全带电，并且也将其归因于自由离子对解离基团的电位的掩蔽作用。

离子强度对不可逆的正向滴定曲綫和可逆的逆向滴定曲綫的影响見图 47。当溶液中的离子强度增加时，可逆的逆向滴定曲綫以平行的形式向低 pH 处移动，这一观察进一步支持了使用簡单形式的解离方程式来全面地解釋这个影响。亦曾观察到离子强度对光譜滴定的影响的同样的平行移动[116]。离子强度增加时的核酸盐滴定曲綫的平行移动可因与取代解离的氫离子的鈉离子的結合而引起[110]。这种見解被在 pH 不变的情况下离子强度发生改变时的脱氧戊糖核酸盐离子的凈电荷的极小改变所支持。例如在 pH 6.0 时，电荷从离子强度为 0.02 时的 0.20 (每个磷原子的电荷数)改变到离子强度为 0.20 时的 0.22[114](参看表 21,第 223 頁)。

Cox 和 Peacocke[110] 对盐效应引起改变的另一种解釋进行了檢査。这个檢査是根据下述两个假定而作的，卽鈉离子完全与核酸盐离子分开和增加氯化鈉的濃度时会对核酸盐阴离子周圍的离子环境产生更大的保护作用。应用 Hill 用于計算脱氧戊糖核酸盐离子靜电自由能的方程式[117] 可以計算出随着离子强度的某一改变而改变的 pH 值。但是，发現这样的解釋需要有一个在电离时比实际所观察到的大得多的分子扩散。因此上述的第一个解釋，卽鈉离子取代氫离子而与核酸盐結合的解釋是比較可取的，并且这个解釋还和其他的証据(主要是光譜滴定的証据)相符合。这个証据指出，在电解质溶液中发生了阳离子的結合。

Jordan、Mathieson 和 Matty[108,118] 曾对电位滴定曲綫和酸碱基团的滴定常数随离子强度的改变作了詳細的研究，而 Cavalieri 和 Stone[119] 对离子强度对光譜滴定曲綫的影响也作了相似的、但不那么詳細的研究。表 18 列出了随着脱氧戊糖核酸盐濃度和离子强度变化的氨基解离。在表 18 中亦列出用光譜滴定法测定的胞嘧啶和鳥嘌呤氨基的 pK'_a 值[119] 以及 Hurlen、Laland、Cox 和

表 18 在不同濃度和离子强度时的脫氧核糖核酸鈉的解离常数(25°C)

核酸盐离子濃度的当量, $4P/l\times10^4$	离子强度	pK′			
		鳥嘌呤	腺嘌呤	胞嘧啶	—NH—CO—
小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉;电位滴定[118]					
0	0	3.45	4.25	5.25	—
1.13	—	3.35	4.20	5.25	—
1.88	—	3.35	4.15	5.20	—
2.81	—	2.95	3.90	5.10	—
3.75	—	2.70	3.75	4.95	—
7.50	—	2.50	3.70	4.90	—
11.25	—	2.40	3.65	4.85	—
14.2	0	2.60	4.05	5.25	—
14.2	0.133	1.90	2.90	4.15	—
14.2	0.255	1.70	2.60	4.04	—
14.2	0.368	1.60	2.50	3.95	—
14.2	0.492	1.50	2.50	3.95	—
14.2	0.622	1.40	2.35	3.65	—
14.2	0.748	<1.4	2.30	3.60	—
14.2	0.871	<1.4	2.24	3.55	—
小牛胸腺脫氧核糖核酸鈉;光譜滴定[119]					
—	0.008	3.70	—	5.30	—
鯡魚精子脫氧核糖核酸鈉;电位滴定[120]					
—	0.050	2.75*	3.50	5.00	{10.65 {11.30
无嘌呤酸;电位滴定[120]					
—	0.05	—	—	5.1	10.1
脫氧核糖核苷-5′-磷酸[121]					
—	0	2.9	4.4	4.6	{9.7† {10.0‡

* 从海胆精子和鳥型結核菌的脫氧戊糖核酸盐的逆向滴定曲綫間的差別推論得到的数值[122]

† 在脫氧鳥嘌呤核苷-5′-磷酸中

‡ 在胸腺嘧啶核苷酸中

Peacocke[120] 从无嘌呤酸滴定所测得的胞嘧啶氨基和胸腺嘧啶的—NH—CO—基的 pK'_a 值（无嘌呤酸就是用酸或酸性离子交换树脂处理脱氧戊糖核酸后除去嘌呤碱所得到的产物）。为了比較，表18中亦列出 Hurst、Marko 和 Butler[121] 所測得的脱氧核糖核苷-5′-磷酸的酸-碱基团的 pK'_a 值。

从表18可以看出解离基团的 pK'_a 值是随着核酸盐濃度和离子强度的改变而显著地改变。pK'_a 值曾从滴定曲綫用簡单形式的解离方程式計算出来；必要时，还要应用对核酸中的单核苷酸組分所进行的适当分析結果。核酸对溶液的离子强度的影响可以略而不計，因为曾观察到[118]磷酸的解离常数并不因核酸的存在而受到影响。

胞嘧啶核苷的 pK'_a 值对分析滴定曲綫中的二級磷酸解离的存在具有特殊的重要性。在这方面，无嘌呤酸的滴定特别重要，因为鉴于在这个酸中沒有嘌呤碱存在，因此可以檢查出胞嘧啶的解离，而且因腺嘌呤氨基解离的重迭所引起的困难也可以避免[120]。鳥嘌呤的 pK'_a 值曾經用比分析核酸盐滴定曲綫更直接的方法求得。海胆精子和結核杆菌的脱氧戊糖核酸中鳥嘌呤的含量有很大的不同。将这两条滴定曲綫相減，可以得到一个和鳥嘌呤的解离曲綫大略相一致的解离曲綫[122]。用这些方法所测得的胞嘧啶氨基和鳥嘌呤氨基的 pK'_a 值曾被 Cox 和 Peacocke[110] 用以詳細分析脱氧戊糖核酸鈉的滴定曲綫。这个分析使他們断定逆向滴定曲綫是一致的，而且沒有可覺察的二級磷酸解离存在。

从正向滴定曲綫所得到的腺嘌呤和胞嘧啶的氨基解离常数是相同的。这两个氨基的解离常数在25°C时均为4.4。但是，从逆向滴定曲綫所得到的数值与这两个数值不同，而且它們之間亦不相同；腺嘌呤的数值为3.65，胞嘧啶的数值为4.85（Jordan、Mathieson 和 Matty[108] 在离子强度为零、核酸盐濃度为 11.25×10^{-4} 当量 P/升时所测得的数据）。因为氫鍵連接使腺嘌呤和胞嘧啶組成相似的八員环，因此这些实驗結果与氫鍵連接的 Watson 和 Crick 模型相符合（参看174頁）。鳥嘌呤的正向滴定和逆向滴

定的 pK'_a 值的相似(分别为 2.50 和 2.40[108])并不象起初所設想的表明鳥嘌呤不参与氫鍵的形成，因为在較低的温度时 pK'_a 值是不同的(参看第十一章,第 259 頁)。在 25°C，当連接胞嘧啶氨基的氫鍵被加入的质子所破坏时，已有明显的足够动力使与鳥嘌呤氨基連接的氫鍵断裂。这个解釋被 Cavalieri 和 Stone[119] 的光譜滴定結果所支持，而且与 Pauling 和 Corey[123] 最初所提出的鳥嘌呤氨基参与氫鍵連接的結构的建議相一致。

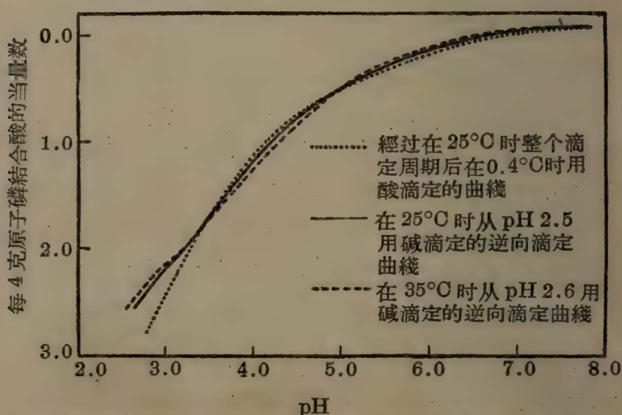


图 48 温度对脫氧戊糖核酸鈉的可逆的逆向滴定曲綫的影响
(R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. chem. Soc.* 1957, 4726 頁)

从研究鯡魚精子脫氧戊糖核酸的电位滴定曲綫随着温度的改变，Cox 和 Peacocke[124] 能够测定氨基的表观解离热 (apparent heat of dissociation)，同时亦能够测定温度对正向滴定曲綫的可逆性的影响。温度对可逆的逆向滴定曲綫的影响見图 48。从这个曲綫并用下列近似的方程式曾計算出解离热:

$$\Delta H' = -2.303RT_1T_2\{(pH_2 - pH_1)/(T_2 - T_1)\}_h$$

方程式中的 h 为酸或碱与核酸盐离子結合的当量数。列在图 49 中的 $\Delta H'$ 值与 Vandendriessche[125] 对核糖核酸所推导出的数值在同一数量級，因此显然 $\Delta H'$ 对 h 有明显的依賴关系；用 Wyman[126] 对蛋白质解离的相似解釋，这个关系可归因于基团解

离的相互重迭。因为 80% 的解离是在 $pH = pK'_a \pm 1$ 的范圍內，所以根据已知的 pK'_a 值（表 18），鳥嘌呤和腺嘌呤氨基的解离应在 pH 3.75 以下时重迭，而腺嘌呤和胞嘧啶氨基的解离应在 pH 4.0～4.5 之間重迭。因此在这些 pH 范圍內，$\Delta H'$ 应随 pH 而改变，而在 pH 3.75～4.0 和 4.5～7 的范圍內，$\Delta H'$ 应为一个常数，在这个 pH 范圍內只有腺嘌呤和胞嘧啶的氨基曾分别被单独滴定过。这些結論与表 19（219 頁）的实驗結果大致相符合。

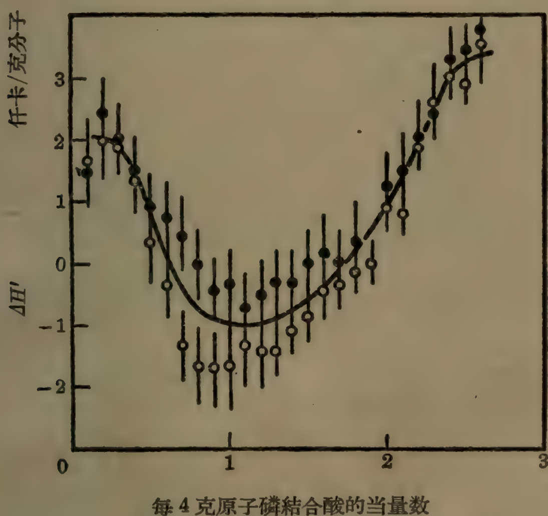


图 49 脱氧戊糖核酸鈉的表观解离热($\Delta H'$)对結合酸的量(h)的依賴关系

(R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. chem. Soc.* 1957, 4727 頁)

在 0.4°C 时的酸-碱基团的电位滴定曲綫具有特殊的兴趣，因为在同一温度下，在正向滴定后所得到的逆向滴定曲綫既不与在較高温度时所得到的逆向滴定曲綫相类似，也不与在較高温度时进行正向滴定后在 0.4°C 时所得到的逆向滴定曲綫相一致（参看图 50，曲綫 II）。这个逆向滴定曲綫比从在較高温度时所得的逆向滴定曲綫較靠近于正向滴定曲綫。因此显然，当将 pH 恢复至中性时，有大部分原来的特有的氫鍵重新形成，而且变性进行[13]

亦不完全。Cox 和 Peacocke[124] 估計在 0.4°C 时完成滴定循环后仍有 60% 的原来氫鍵保留下来。这些特别与核酸变性理論有关的观察将在第十一章中再加以討論。

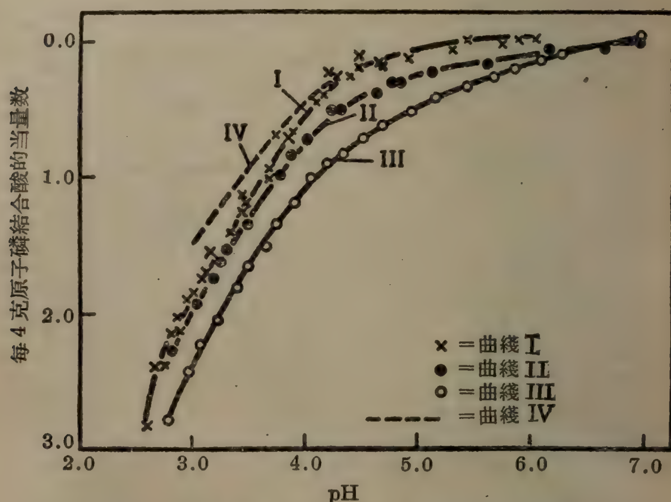


图 50 在 0.4°C 时在 0.05 *M* 氯化鈉溶液中的脫氧戊糖核酸鈉的滴定曲綫

I. 从 pH 6.1 开始的用酸滴定的正向滴定曲綫； II. 从 pH 2.6 开始的用碱滴定的逆向滴定曲綫； III. 在 0.4°C 时用酸滴定曾經在 25°C 时从中性滴定到 pH 2.75 再滴回至 pH 7 的核酸盐的滴定曲綫； IV. 根据脫氧戊糖核酸鈉双螺旋构型計算得到的正向可逆滴定曲綫，即沒有經过变性的滴定曲綫

(R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. chem. Soc.* 1957, 4725 頁)

图 50 亦画出估計的脫氧戊糖核酸鈉双螺旋結构的可逆正向滴定曲綫(曲綫 IV)。当然，一般所得到的正向滴定曲綫具有复杂的性质，因为双螺旋結构在滴定过程中被破坏了。因此在正向滴定过程中的最后几个阶段事实上是指变性的核酸。与在較高温度时所观察到的不可逆变性相比，在 0.4°C 时因电离所发生的較小程度的不可逆变性使人們能够估計出以氫鍵連接的結构的滴定曲綫。

表 19 $\Delta H'$ 随 pH 改变所作的解釋

h 范 圍	pH 范 圍（近似值）	$\Delta H'$（仟卡/克分子）	指 定 的 基 团
>1.40	<3.75	变动的	鳥嘌呤-2-氨基 腺嘌呤-6-氨基
1.40～0.85	3.75～4.35	−1.0	腺嘌呤-6-氨基
0.85～0.40	4.35～5.50	变动的	腺嘌呤-6-氨基 胞嘧啶-6-氨基
0.40～0.10	5.50～7.00	約 +2.0	胞嘧啶-6-氨基
—	9.50～11.0	+6.0	鳥嘌呤和胸腺嘧啶 —NH—CO—

(R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. chem. Soc.* 1957, 4730 頁)

脱氧戊糖核酸盐离子上的电荷

改变溶液中离子强度所引起的脱氧戊糖核酸盐离子的形状和柔性的輕微改变可能与这个离子的电荷改变有关。测定这个电荷有三种方法。Creeth 和 Jordan[127] 与 Shack、Jenkins 和 Thompsett[128] 从膜电位的测量测定了核酸盐离子上的电荷。膜电位就是用只有电解质离子能透过而胶体顆粒不能透过的膜将胶体溶液和緩冲溶液隔开，而这两个溶液成 Donnan 平衡时所存在的电位。从膜电位可以测出胶体离子的当量濃度，并且只要知道其分子量即可計算出电荷。

核酸盐离子上的电荷亦曾从电泳迁移率测定出来。脱氧戊糖核酸盐离子向阳极移动的速度高[129~133]，这可从电离的一級磷酸解离对电荷所发生的具有占优势的影响預期得到。这个向阳极移动的速度与溶液的 pH 及离子强度有关[114,133]，但与核酸盐离子的濃度几乎无关[129,133]。在良好的制品中核酸盐离子以单純的界区方式移动，这个界区是超清晰的，而且与用沉降法所得到的界区非常相似。从他們所测得的电泳迁移率，Mathieson 及其同工者[63,114] 应用了将电泳迁移率与电荷及大分子粒子大小联系起来的 Gorin 方程式[134] 計算出在不同离子强度和 pH 值下的淨电

荷。这两种测定电荷的方法都受到了批評。为了要得到合理的膜电位值，在第一种方法中需要应用高濃度的核酸盐溶液(約0.8%)，在这个溶液中分子間的相互作用是重要的。因此所测定的电荷与存在于更低濃度溶液中的电荷并沒有任何显著关系。应用第二种方法計算电荷时，需要知道大分子离子的长度和半徑。所用的数据是从流动双折射的测定得到的[63,114]。象在上面所提到的，这个方法亦受到批評。并且所得到的电荷数值与核酸盐离子的长度有明显的关系[114]。

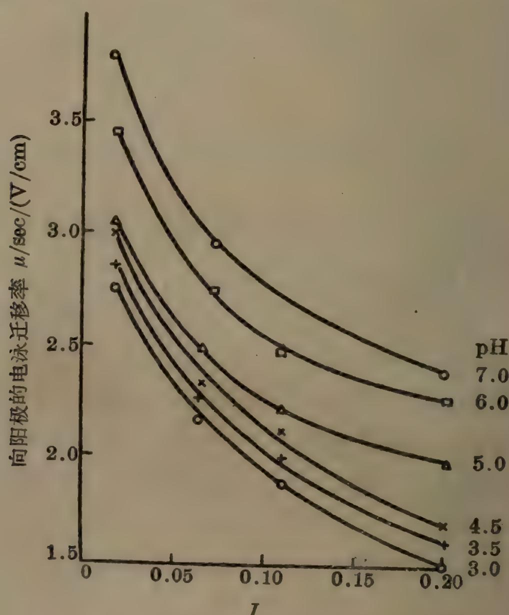


图 51 在不同 pH 值和离子强度(I)下的脱氧核糖核酸盐离子的电泳迁移率的变化
(A. R. Mathieson 和 J. V. McLaren: *J. chem. Soc.* 1956, 304 頁)

鉴于应用膜电位法和电泳迁移率方法来测定电荷具有困难，Inman 和 Jordan[135] 应用了 Huizenga、Grieger 和 Wall 的方法[136]，这个方法包括导电度和迁移数的测定。应用这个方法可以测定在每个磷酸基团上的有效电荷分数而不需要作任何适当的假

定。但是，这个方法只能对沒有加入电解质的脱氧戊糖核酸鈉溶液进行测定，因此所得的結果会因在低离子强度溶液中所发生的变性而变得复杂起来(参看第十一章)。

图 51 和 52 表示出电泳迁移率随着离子强度和 pH 的变化而改变的情况。Creeth、Jordan 和 Gulland[133] 所用的小牛胸腺脱氧核糖核酸样品与 Mathieson 和 McLaren[114] 所用的小牛胸腺脱氧核糖核酸的样品不同，后者为較好的制品。他們所用的样品不同可能是他們所观察到的电泳迁移率有些不同的緣故，虽然这两

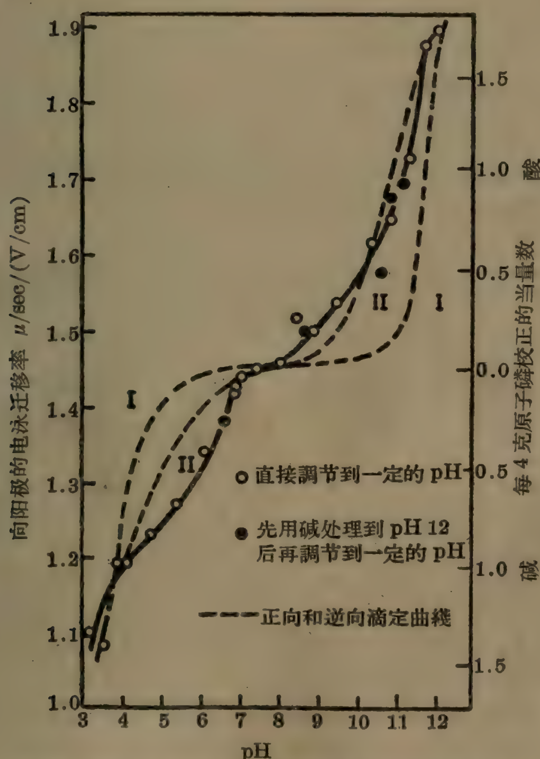


图 52 随着 pH($I=0.20$)改变的脱氧核糖核酸盐离子电泳迁移率的变化

(J. M. Creeth, D. O. Jordan 和 J. M. Gulland: *J. chem. Soc.* 1949, 1407 頁)

个样品的一般性质是相同的。电泳迁移率随着pH改变的原因可以根据酸碱基团电离的不同来解釋。但是，电泳迁移率随着离子强度不同而改变的原因比較复杂，而且还不完全清楚(参看下面)，但知其与解离常数的变化和結合的反离子的数量和本性有关。

根据前面所作的假定，用膜电位法和电泳迁移率法在pH 7时所計算出的在核酸盐离子上的电荷分数值(即每个磷原子所带的电荷数)列在表20。虽然用不同方法，或者用同一方法但由不同研究工作者所得到的数值有所不同，但仍有一致的地方，即在pH 7时的电荷分数比1小得多，并且是在0.2与0.4之間。将这些数值外推至离子强度为零时所得的电荷分数值在0.18到0.38的范圍內，这个数值与图53中Inman和Jordan在較高核酸盐濃度时所測得的結果相符合。在更低的濃度时，电荷分数值随着溶液的稀释程度而增加，到无限稀释时則达到1的最大值(图53)。

表20 用不同方法在pH 7时所得的脫氧戊糖核酸盐离子的电荷分数值

离子强度	Q		
	膜电位[127]	膜电位[128]	电泳迁移率[114]
0.005	0.21	0.40	—
0.010	0.21	0.45	—
0.020	0.22	0.41	0.21
0.050	0.27	0.52	0.22
0.080	0.29	0.54	—
0.100	0.31	0.53	0.23
0.200	0.37	0.45	0.24

虽然在pH 7时电荷分数值随着离子强度有少許的增加，但在更低的pH时，电荷分数值在实驗誤差范圍內保持不变[114](表21)。从滴定数据[63](表22)計算所得的理論电荷分数值与实际測得的电荷分数值之差等于在結合的反离子上的电荷。表20中的所有数据所表示的随着离子强度的增加而增加的負电荷分数值未

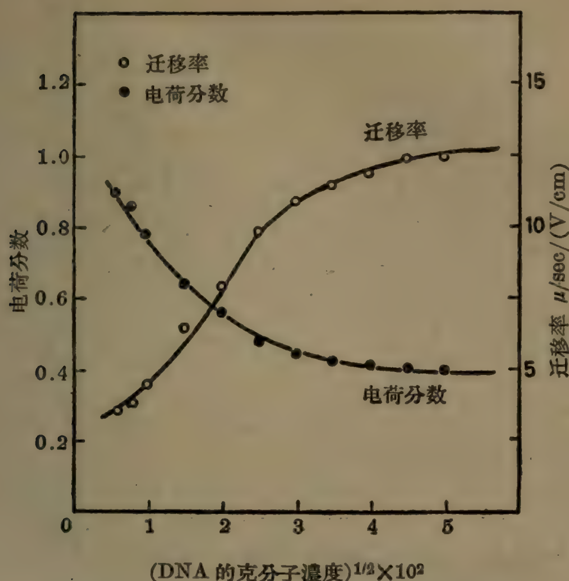


图 53 脱氧戊糖核酸盐离子的迁移率和电荷分数值[135]

表 21 随着 pH 和离子强度改变的脱氧戊糖核酸盐离子的电荷分数值

pH	离子强度			
	0.02	0.05	0.10	0.20
3.0	0.09	0.09	0.09	0.09
4.5	0.17	0.17	0.17	0.17
6.0	0.20	0.21	0.21	0.22
7.0	0.21	0.22	0.23	0.24

(摘自 A. R. Mathieson 和 J. V. McLaren: *J. chem. Soc.* 1956, 305 頁)

必是因为結合的鈉离子的数量减少所引起，而更可能是由于阴离子（氯离子）結合的量增加的緣故[127]。这个見解是从 Shack、Jenkins 和 Thompsett[128] 的平衡透析的研究結果所产生的。他

表 22 从 pK'_a 值計算得到的脫氧戊糖核酸盐电荷分数的理論值

pH	核酸盐濃度*×10⁴ (不加电解质)				核酸盐濃度 14.2×10⁻⁴ 离子强度					
	0	2.81	3.75	11.25	0	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7
3.0	0.41	0.43	0.48	0.53	—	—	—	—	0.55	0.61
3.5	0.50	0.55	0.60	0.62	0.50	0.57	0.61	0.67	0.73	0.76
4.0	0.57	0.65	0.70	0.72	0.63	0.70	0.75	0.80	0.86	0.90
4.5	0.74	0.74	0.80	0.81	0.75	0.81	0.86	0.90	0.94	0.96
5.0	0.84	0.86	0.88	0.89	0.78	0.91	0.94	0.96	1.00	—
5.5	0.92	0.93	0.95	0.96	0.93	0.97	0.99	—	—	—
6.0	0.98	0.99	1.00	1.00	0.99	—	—	—	—	—

* 核酸盐濃度的当量数 4P/升

(摘自 A. R. Mathieson 和 S. Matty: *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, 755 頁)

們得到了与氯离子結合的証据。因此看来鈉离子仅与已电离的磷酸基团相結合的假定是合理的，因为在 pH 2 以上时，pH 值的改变对这些基团的电离并沒有影响；很可能在所有离子强度下，結合的鈉离子数目仍保持不变[114]。大离子上的电荷数目随着离子强度的改变因而很可能是由于氯离子与电离的或未电离的氨基結合的結果。到底这些离子是否很牢固地与特殊基团結合成离子对或者只是因为电位結合 (potential binding) 的結果而很松弛地与核酸盐离子相結合，还不能从电荷测定的研究加以确定。有关离子結合的相对程度的进一步考虑将在下节中討論。

脫氧戊糖核酸与金属离子和有机阳离子的相互作用

在核酸盐离子上的电荷分数值表示大部分的电离基团是有效地被作为一部分动力单位的附属反离子所中和。关于不同离子与脫氧戊糖核酸盐离子的結合或相互作用，曾經用观察与离子相互作用有关的紫外吸收光譜的改变、平衡透析和电导滴定来进行

研究。脫氧戊糖核酸的紫外吸收光譜和其他的核酸一样，在 259 mμ 处有一个明显的吸收峰。这是由于嘌呤碱和嘧啶碱的发色基团的吸收所引起的(图 54)。在这个波长处的吸收程度不仅与溶液的 pH 和离子强度有关，而且也与核酸样品的預先处理有关。由于核酸的含水量不恒定，因此核酸的克分子吸收能力不能以核酸的重量为根据，因为所得的'干'重是沒有多大意义的。但是，在核酸中每有一个嘌呤分子或嘧啶分子就有一个磷原子，因此 Chargaff 和 Zamenhof[141] 曾建議核酸溶液的吸收应該用每升中每克原子磷的吸收能力来表示。这个量現在已普遍地被采用，并且用符号 ϵ(P) 来表示。

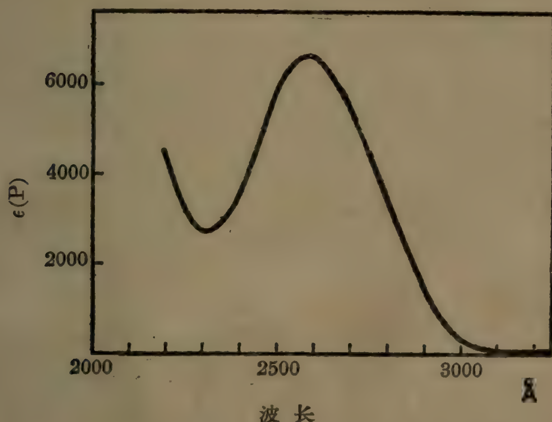


图 54 小牛胸腺脫氧核糖核酸的紫外吸收光譜[127]

脫氧戊糖核酸在 259 mμ 处的 ϵ(P) 值在所有 pH 和离子强度的条件下比人工混和的核苷酸所計算出来的数值要低得多(图 55[138~140])。这个数值在脫氧戊糖核酸变性时增加，在进一步降解到核苷酸和核苷时接近于理論值。紫外吸收是由与分子主軸有关的特定方向定位的[142]、并常被假定为是在 Watson 和 Crick 模型中的嘌呤和嘧啶环系平面上的特殊的电子軸所引起的；但是这个見解尚未被証实过。任何用断裂氫鍵或破坏核酸使变成核苷酸和核苷的方法来改变有秩序的結构都会导致嘌呤和嘧啶环系的更紊

乱的排列。这个改变会使 ϵ(P) 值自行增加[142]，否则这个 ϵ(P) 的增加可由环系的有效发色团面积的增加而引起[143]。在多核苷酸鏈中的两个相邻环系間的相互作用，即使是发生在合成的小分子多核苷酸如二-、三-和四-腺嘌呤核苷酸[144]以及因偶极的相互作用[145]和生成 π-鍵[146]所引起，亦将明显地受到原来的有秩序的結构的任何改变所影响，并且也是吸收改变的部分原因。

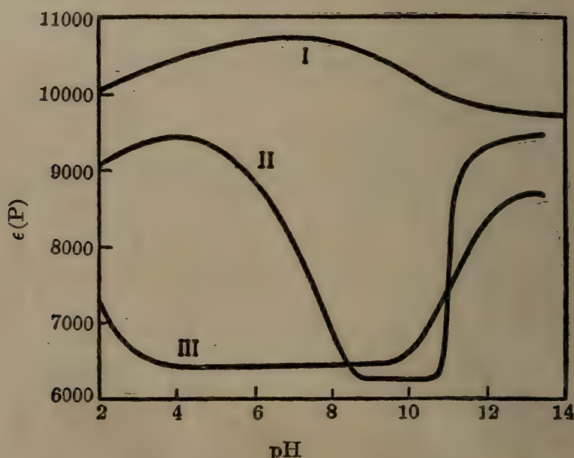


图 55 脱氧核糖核酸的 ϵ(P) 随着 pH 的变化[135~140]

I. 为腺嘌呤核苷、鳥嘌呤核苷、胞嘧啶核苷和胸腺嘧啶核苷，其克分子比为 4:3:3:4 的混合物而計算的；II. 在沒有电解质时脱氧戊糖核酸的 ϵ(P) 的变化；III. 在 1M 氯化鈉溶液中的脱氧戊糖核酸的 ϵ(P) 值的变化

鉴于大分子中嘌呤和嘧啶环系的定向对紫外吸收具有敏感性，因此 ϵ(P)值对脱氧戊糖核酸結构的改变亦非常敏感，并不奇怪。Thomas[145,147] 首先观察到脱氧戊糖核酸溶解在純水中或者在濃度低于 10^{-3} M 的氯化鈉溶液中会引起与变性同时发生的結构的不可逆变化。虽然这些变化将在第十一章中詳細討論，但仍有必要在这里强調这个观察的重要性，因为这可能对发現这个結果前所下的結論发生影响。为了防止这种不可逆变性的发生，必須将脱氧戊糖核酸鈉溶解在濃度大于 10^{-3} M 的氯化鈉溶液中，并且在

制备样品或溶解过程的任何一个步骤中，电解质的濃度都必須不低于这个濃度。这样可以得到在 0.1 M 氯化鈉溶液中的 ϵ(P) 值大約为 6400 的溶液（图 54）。将核酸盐溶于濃度低于 10^{-3} M 的电解质溶液中会使其 ϵ(P) 值增加到 7400。因此 ϵ(P) 值可以作为核酸盐变性的一个很好的指标。但是，只要能够产生濃溶液，則仍有可能将脱氧戊糖核酸鈉溶解在水中而不致发生显著的变性。但随后必須用电解质溶液加以稀释。

与无机离子的結合

Shack、Jenkins 和 Thompsett[148] 首先定量地研究了天然脱氧戊糖核酸溶液因加入电解质所发生的 ϵ(P) 值的降低情况。他們观察到当加盐于脱氧戊糖核酸盐溶液中时，其光密度降低。虽然这些研究者将脱氧戊糖核酸鈉溶解于沒有电解质的水中，但所得到的在 259 mμ 处的最大吸收仍表示出并沒有显著的变性发生。但是，他們所作的对鎂离子結合的研究指出（参看下面）样品已經变性了。加入电解质对在 259 mμ 处的吸收所发生的影响表示在图 56 中。从图中可以看出，在开始时吸收的减少是随着加入电解质的量而增加的，但在高濃度时則吸收不再改变。从图 56 显然可以看出加入电解质所发生的影响与阳离子上的电荷数目有很大的关系，二价阳离子在濃度低得更多的情况下对吸收的降低比一价阳离子为有效。阴离子的本质对降低吸收似乎很少影响。从图 56 也可以看出，使吸收发生变化所需的任何二价阳离子的量大約等于脱氧戊糖核酸鈉中磷的含量。Shack、Jenkins 和 Thompsett[148] 因此断定 ϵ(P) 的降低是和核酸盐与二价阳离子的結合同时发生。在不同核酸盐濃度中所作的研究支持了这个見解，在这个研究中发現吸收光譜改变的程度主要是一个二价阳离子濃度与核酸盐磷濃度之比的函数，而不是盐濃度本身的函数。Lawley[140] 曾得到相似的結果，并且亦企图去获得核酸盐离子与个别阳离子的結合常数。他所发現的这些阳离子的結合能力是按照 K^+、Na^+、Mg^{2+}、H^+ 的次序而增加的。Cavalieri[149] 从加入鎂离

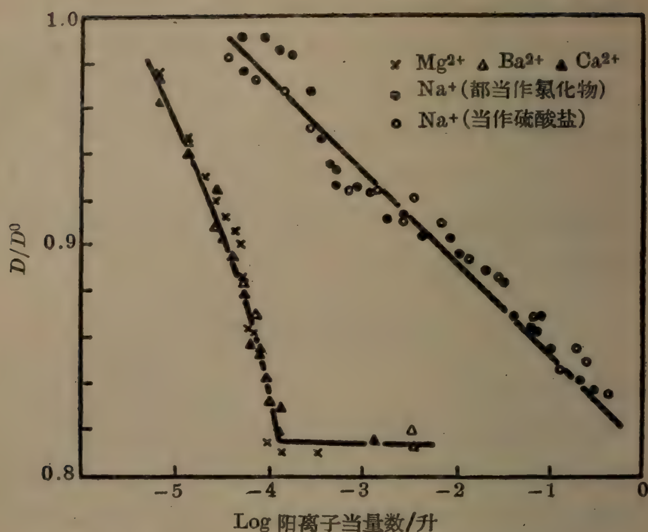


图 56 加入电解质对脱氧戊糖核酸鈉光密度值的影响
(J. Shack, R. J. Jenkins 和 J. M. Thompsett: *J. biol. Chem.* 1953, **203**, 375 頁)

子到核酸盐溶液中所发生的 pH 改变的研究亦曾断定鎂离子是牢固地与核酸盐离子相結合，并且认为这个鎂离子是同时与磷酸基团和氨基相結合的。鎂离子与氨基的結合是根据在氨基上电荷发生改变的 pH 范圍內鎂离子对吸收光譜所发生的影响而証实的。

Katz[46] 曾对氯化汞与脱氧戊糖核酸鈉的相互作用进行了研究，但在这种情况下，因为核酸盐与高汞离子之間的作用是如此之大，以致所沉淀下来的主要是沒有作用完全的脱氧戊糖核酸的高汞盐。Stern 和 Steinberg[150] 曾研究过脱氧戊糖核酸与鑭系元素所成的絡盐。

核酸盐阴离子和无机离子的結合亦可以从不同的电解质加入到水中和脱氧戊糖核酸盐溶液中时所发生的导电度增加的比較来研究。因为大分子阴离子能与阳离子結合，因此可以預期到在后者的溶液中所发生的导电度增加将比在含有同濃度电解质的水中所发生的导电度增加为小。但是，天然脱氧戊糖核酸的导电行为会

因盐的加入对溶液粘度所发生的显著影响而变为复杂，結果使大分子的有效迁移率和离子导电度增加。

Shack、Jenkins 和 Thompsett[148] 首先采用这个方法来研究鎂离子与脱氧戊糖核酸的結合。因为所用的样品曾溶解于沒有电解质的水中，因此必須认为这个样品已經变性。在一个給定濃度的氯化鎂溶液中，发現含有脱氧戊糖核酸鈉的溶液的导电度比不含有脱氧戊糖核酸鈉的溶液的导电度为小。Shack、Jenkins 和 Thompsett[148] 解釋这个結果认为是表示鎂离子与核酸盐离子的强烈結合。他們还計算出每一原子磷可与 0.82 当量的鎂离子

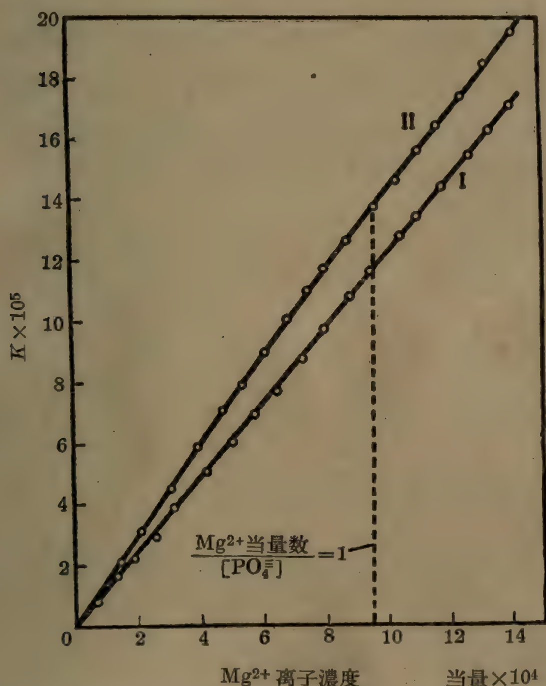


图 57 用 Mg^{2+} 对脱氧核糖核酸鈉进行的电导滴定比导电度的增加对 Mg^{2+} 的当量濃度作曲綫

I. 用 Mg^{2+} 对水进行的滴定曲綫；II. 用 Mg^{2+} 对核酸盐离子进行的滴定曲綫(核酸盐濃度为 3.4×10^{-4} g/ml)

(G. Zubay 和 P. Doty: *Biochim. biophys. Acta* 1958,29, 51 頁)

結合。

Zubay 和 Doty[51] 应用脱氧戊糖核酸盐的眞正天然样品重复了这个实驗，并发現与 Shack、Jenkins 和 Thompsett[148] 的結果相比时，在一个給定濃度的氯化鎂溶液中，含有核酸盐溶液的导电度要比氯化鎂在純水溶液中的导电度为大(图 57)。但是，热变性的核酸盐样品显示出与 Shack、Jenkins 和 Thompsett 所观察到的完全相同的性质，即含有变性核酸盐的溶液的导电度要比相同濃度的氯化鎂水溶液的导电度为小(图 58)。Zubay 和 Doty[151] 对这种天然脱氧戊糖核酸盐的性质的解釋是：因为分子間的相互作用受到抑制，鎂离子在所研究的濃度范圍內对降低脱氧戊糖核酸鈉溶液的比粘度非常有效。人們认为核酸盐大离子的摩擦阻力也大大地被减少了，这一結果会使导电度增加。这个增加大概会比

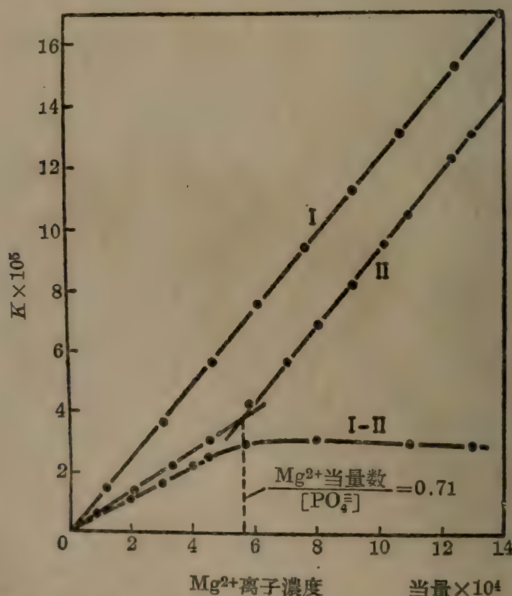


图 58 用 Mg^{2+} 对变性脱氧戊糖核酸盐进行的电导滴定

I. 用 Mg^{2+} 对水进行的滴定曲綫；II. 用 Mg^{2+} 对核酸盐进行的滴定曲綫(核酸盐濃度为 2.6×10^{-3} g/ml)

(G. Zubay 和 P. Doty: *Biochim. biophys. Acta* 1958, **29**, 52 頁)

用于补偿由鎂离子的結合所发生的任何导电度的减少为多，而总的导电度是增加了。但是，对銅离子来讲，与核酸盐离子結合的程度是这样的，即当与水溶液的导电度相比时，核酸盐溶液的导电度是减小了。在这种情况下，因离子的結合所造成的核酸盐离子的更低的迁移率比用于补偿抑制分子間的相互作用而使粘度降低的效应为大。

鉴于用与鎂离子的結合来解释对天然脱氧戊糖核酸所测得的导电度具有困难，因此 Zubay 和 Doty[151] 采用平衡透析法来测定在 0.2 M 氯化鈉溶液中的鎂离子与脱氧戊糖核酸的結合，并发現其結合程度（图 59）比鎂离子与变性的核酸盐的結合程度要低得多，他們所得到的結合量为每一原子磷只有 0.71 当量的鎂，这与 Shack、Jenkins 和 Thompsett[148] 所得到的数值 0.82 相当接近。

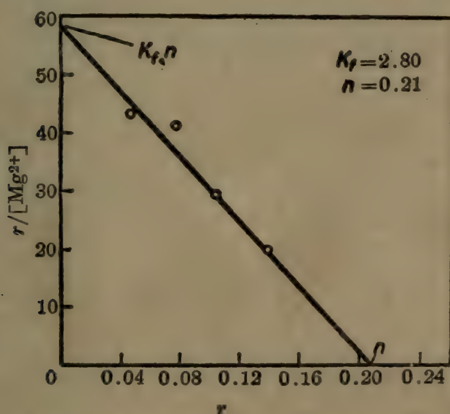


图 59 在 0.2M 氯化鈉溶液中 Mg^{2+} 与脱氧核糖核酸盐的結合。結合的 Mg^{2+} 与每个核苷酸之比用 r 代表；K_f 是結合常数，n 是每个核苷酸的結合位置数

（摘自 G. Zubay 和 P. Doty: *Biochim. biophys. Acta* 1958,**29**, 50 頁）

脱氧戊糖核酸鈉溶液的当量导电度对濃度的依賴关系提供了关于与鈉离子結合的一些知識。大部分的多聚电解质是相当柔軟的分子；当将它們的鈉盐溶液稀釋时，只能观察到当量导电度的些微增加。这通常被解釋为是由于和核酸盐离子結合的反离子解离

所生成的較大的导电度与大分子离子因增加摩擦阻力而产生膨脹所成的低导电度間相互补償的結果。但是，脱氧戊糖核酸盐阴离子，象已經指出过的，是比較不柔軟的。因此当結合的反离子在稀釋过程中从大分子离子解离出来时，导电度一定是显著地增加，因为未結合的反离子的数目和核酸盐离子上电荷的数目在沒有通过膨脹而增加摩擦阻力的情况下均增加。这个預計与当量导电度的数据（图 60）相符合，因此可以断定[151] 鈉离子是与圍繞在核酸盐大离子周圍的电位輕微地結合。

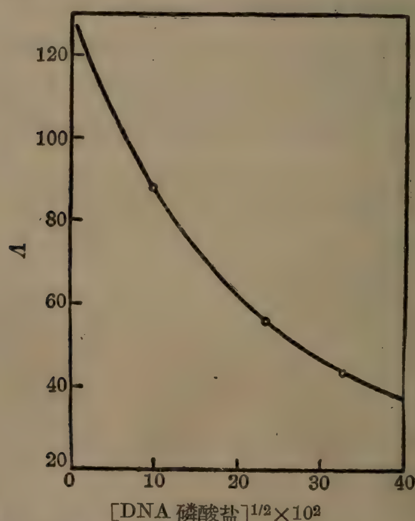


图 60　脱氧核糖核酸鈉在水中的当量导电度
(G. Zubay 和 P. Doty: *Biochim. biophys. Acta* 1958, **29**, 49 頁)

Zubay 和 Doty[151] 因此得出結論，认为鈉离子、鎂离子和銅离子与核酸盐离子的結合次序应依照 Na^{+}、Mg^{2+}、Cu^{2+} 的順序而增大。鈉离子只是輕微地結合着而且不是位于特殊的位置上；鎂离子的結合是比較牢固的，但是結合的程度仍被认为不能牢固到这样的程度以致能够指出鎂离子是位于特殊的位置上。但是，銅离子被认为是在特殊的位置上牢固地結合着，而且与相邻的分子通过与磷酸基团的螯合而发生聚集作用。

与有机离子的結合

核酸能与有机染料相結合,已經知道了很久,而且成为檢查細胞組織的許多組織学方法的基础。但是仅在最近才系統地和广泛地对这个結合的机制和結合位置的本质进行了研究。这些研究工作現在更扩大到其与氨基酸的結合和蛋白质的結合。研究与氨基酸結合的目的是想发現其可能的特殊結合位置的存在。这些位置对脱氧戊糖核酸的模板复制机制的研究是必需的。

Bank 和 Bungenberg de Jong[152] 从观察某些染料与胶体顆粒相互作用后所发生的吸收光譜的特殊改变，卽所謂偏色效应(metachromatic effect)，首先研究了染料与脱氧戊糖核酸的相互作用。对一些染料来讲，这个效应可以因增加染料本身的濃度而产生。这就导致这样的見解，卽这个效应是与染料聚集成胶体胶胞(micelles)有关。而那些不需要有胶体顆粒存在卽能表現出这个效应的染料曾被指出是在溶液中产生了聚集。

Michaelis[153,154]、Lawley[155]、Massart、Coussens 和 Silver[156] 与 Weissman、Carnes、Rubin 和 Fisher[157] 用脱氧戊糖核酸作为开始物对这个效应作了广泛的研究。如果一个多聚电解质分子中的两个有关結合位置(如为阳离子染料,则为負电荷的位置)間的距离是小的,则根据两个或多个邻近位置是否已經被占据,染料阳离子所占的相邻位置,若是空間允許的話,象分子平面几乎垂直于多聚电解质的分子表面的平面构型的位置那样，将构成‘二聚’或‘三聚’类型的染料結合。在溶液的所有 pH 值在大約是 1 以上时，由于分子中有荷电的磷酸基团存在，在脱氧戊糖核酸盐阴离子上每 3.4 Å 处都有一个負电荷。如果每个磷酸基团都与一个染料离子結合,则相邻的两个离子将处于充分接近的位置,使在它們之間能够产生 van der Waals 力的相互作用，以致可以引起染料吸收光譜的改变。Lawley[155] 因此认为在表示这个效应的染料(例如玫瑰紅)的吸收光譜中所产生的新的吸收峰是由于染料产生聚合作用所引起,因为当染料溶液的濃度增加时,染料是与核酸盐大分

子离子相結合的。因此結合的阳离子可分成三組：(1)'单体',它的两边位置被鈉离子所占据或未被鈉离子所占据，(2)'二聚体',它的一个相邻的位置被一个染料阳离子所占据,和(3)'多聚体',相邻的两个位置都被染料阳离子所占据。从这些考虑出发，似乎所涉及的結合位置是与簡单的无机离子相結合的位置相同。事实上偏色效应可以因氯化鈉溶液的濃度大大增加而受到抑制[153]。

Cavalieri 和 Angelos[158] 用玫瑰紅試験和用平衡透析法所得的結果以及 Cavalieri、Angelos 和 Balis[159] 用玫瑰紅和氯化三甲(p-(p-羥基苯偶氮)苯)銨〔trimethyl-(p-(p-hydroxybenzeneazo)-phenyl)-ammonium chloride〕試験和分配分析法 (partition analysis method)所得的結果都支持了阳离子染料的結合位置与无机离子的結合位置是相同的結論。Irvin 和 Irvin[160] 用 9-氨基吖啶試験所得的結果亦与这个結論相符合。和上面所討論过的一价和二价无机阳离子的結合力的相对强度一致，Lawley[161,162]、Cavalieri、Angelos 和 Balis[159] 与 Peacocke 和 Skerrett[163] 发現二价的无机阳离子取代所結合的有机阳离子的能力要比一价阳离子更为有效。

根据他們所进行的玫瑰紅与脫氧戊糖核酸盐离子結合的研究，Cavalieri 和 Angelos[158] 发現他們的結果不能服从下面的簡单关系式：

$$\frac{r}{c}=kn-kr$$

式中 r 为与每克分子核酸盐离子相結合的染料量，c 为平衡时的濃度，n 为每个分子結合位置的数目，k 为特性結合常数 (instrinsic binding constant)。他們断定这个偏差并不是由于相互之間的靜电引力作用所引起，因此用染料分子具有两个不同亲和力的結合位置来解釋他們的結果，并且认为这两个位置都是单酯化和二酯化的磷酸基团。为了要解釋实験的数据，所需要假定的单酯化磷酸基团的比例数应为磷酸基团总量的 $\frac{1}{15}$ 至 $\frac{1}{80}$ 之間。这样大量的单酯化磷酸基团的存在会使人认为，这个大分子不是带有很

多的支鏈，就是象 Dekker 和 Schachman[164] 所认为的在单独的多核苷酸鏈中有很多的裂隙。

虽然早期的电位滴定結果的确提示出有一些二級磷酸基团解离，象在单酯化的磷酸基团所发生的，但是最近研究的結果并不支持这个想法（参看 174 頁），而所有的証据都暗示在每个双螺旋結构中的脫氧戊糖核酸盐离子都包含有两条連續的、沒有支鏈的多核苷酸鏈。Heilweil 和 van Winkle[164] 在发展了 Oster[165] 用分配分析观察其相互作用对脫氧戊糖核酸消灭吖啶黃螢光所作的研究后，为了要和 Cavalieri 和 Angelos 的实驗結果相符合，亦断定了結合的位置是不均一的，并且有一小部分的位置具有較大的特性亲和力，而大部分的位置則具有較小的特性亲和力。但是在另一方面，Irvin 和 Irvin[160] 从研究 9-氨基吖啶与脫氧戊糖核酸結合的結果和 Lawley[162] 根据 5-氨基吖啶和玫瑰紅的結合，都报道了沒有結合位置的不均一性的証据。

Peacocke 和 Skerrett[163] 似乎已解决了結合位置的不均一性問題。他們在詳細研究了各种氨基吖啶与脫氧戊糖核酸的結合情况时并沒有发現 $\frac{r}{c}$ 和 r 之間的直綫关系（图 61），而这个直綫关

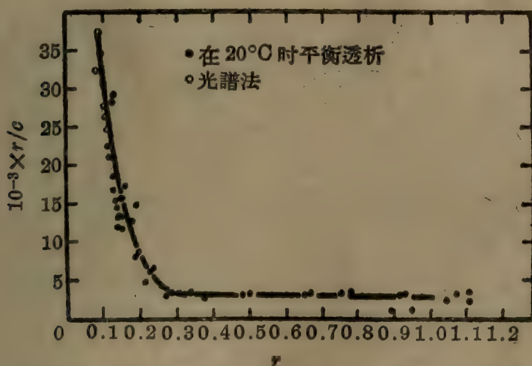


图 61 脫氧戊糖核酸鈉（$I=0.10$）与前黃素的結合情况。在游离絡合剂濃度为 c 克分子/升时每个核酸盐离子所結合的絡合剂的数目用 r 来表示

（A. R. Peacocke 和 J. N. H. Skerrett: *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, 272 頁）

系是上面列举的簡单关系式所要求的。他們的研究結果与 Cavalieri 和 Angelos[158] 的結果非常相似,这些結果以前曾被解釋为是表示有两种类型的結合位置存在(参看上面)。但是,Peacocke 和 Skerrett[163] 曾注意到这样的事实,卽前黃素与鲱魚精子脫氧核糖核酸的結合曲綫(图 62)的形状是象 S 形向两个方向弯曲的。这种类型的吸收曲綫以前曾在固体吸收某些气体的情况下观察到,并且曾被解釋为是被吸附的分子之間的相互作用。 Peacocke 和 Skerrett 因此曾用前黃素分子間的結合,亦用前黃素——前黃素分子在核酸盐表面上的相互作用来解釋他們所得的結果。这种解釋导致有两种明显的結合程序牵涉在內的結論:第一,当結合的染料的量少而且涉及染料与核酸盐結合位置有直接相互作用时就有一个强烈的、主要的結合。第二,当結合的染料的量多而且涉及游离染料与結合染料的結合或且直接与染料聚集物的結合时,則发生一个极弱的結合。看来很可能这样的結合机制也可以恰当地用以解釋 Cavalieri 和 Angelos[158] 以及 Heilweil 和 van Winkle[164] 所得的实驗結果。因此可以断定在核酸盐离子上的結合位置是均一的,这个結論与发展到目前为止的关于脫氧戊糖核酸結构的概念是符合的。

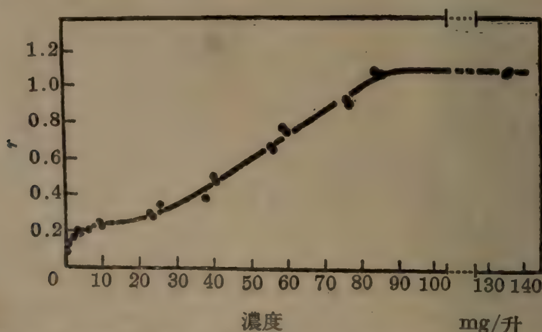


图 62 在 20°C 和 pH 6.9 ($I=0.1$) 时用平衡透析法测定鲱魚精子脫氧戊糖核酸鈉与前黃素的結合。在游离絡合剂濃度为 c 克分子/升时每个核酸盐离子所結合的絡合剂的数目用 r 来表示 (A. R. Peacocke 和 J. N. H. Skerrett: *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, 273 頁)

Morthland、de Bruyn 和 Smith[166] 以及 Lawley[162] 曾对不同的有机阳离子的結合力进行了比較。二价阳离子如 2, 8-二氨基吖啶比一价阳离子結合得更牢固，这是一个与簡单的无机阳离子相似的性质，而且可能是由于二价阳离子同时与相邻的两个二价磷酸基团結合的緣故。氨基吖啶的結合力比玫瑰紅的結合力要强得多[162]，并且这个結合会因核酸变性[162,163,167]和除去嘌呤碱形成无嘌呤酸后而大大地减弱[163]。这种减弱可以认为是由于天然核酸的嘌呤碱和嘧啶碱的扁平环系与氨基吖啶的扁平环系間的更特殊的、可能是 π-軌道的相互作用所引起的。这种相互作用是具有电荷的氨基与磷酸基团間的相互作用的添加，而且更为专一，其专一性随着一种化合物到另一种化合物而变更。

Zubay 和 Doty[151] 曾用平衡透析法去找寻脱氧戊糖核酸与某些氨基酸間的专一相互作用的实驗証据，他們沒有观察到絲氨酸、谷氨酸或精氨酸中有这样专一相互作用的証据，虽然最后一个氨基酸結合得比其他两个更牢固。它与脱氧戊糖核酸最可能是借非专一的静电引力的相互作用而結合的。曾經用了各种不同实驗技术广泛地研究过脱氧戊糖核酸与蛋白质之間的相互作用[129,168~174]，并且曾发現在适宜的 pH 和离子强度的条件下有可溶性的絡合物生成。但是，沒有观察到有任何专一結合的証据，因此曾断定結合的程序并不涉及脱氧戊糖核酸盐离子形状的可以識別的改变[173]。

在非水溶剂中脱氧戊糖核酸性质的研究

乙醇是除水以外的唯一溶剂用作研究溶剂对脱氧戊糖核酸所具的性质。Geiduschek 和 Gray[175] 曾指出如果将脱氧戊糖核酸的水溶液对蒸餾水进行較长时間的透析使溶液中的电解质先完全除去，则核酸可以因对逐渐增加在水中的乙醇濃度进行透析的方法使其溶解在乙醇中；最后对 98% 乙醇进行透析就可以得到脱氧戊糖核酸溶解在乙醇中的溶液。

Coates 和 Jordan[176] 曾重复并发展了 Geiduschek 和 Gray 的工作，他們发現所得到的沉降界区与从脱氧戊糖核酸在 0.2M 氯化鈉溶液中所观察到的有明显的不同，即前者不是超清晰的界区，但迅速扩散，生成一个正常的对称界区。所測得的沉降系数极高，在 50 到 110 S 之間，虽然从光散射法[175]測得的分子量与从水溶液中所观察到的沒有多大差別。分子的大小[175] 以及沉降和扩散的行为[176] 都表明分子大小从在水溶液中伸展的自由卷曲到在乙醇中的不再伸展或局部伸展的自由卷曲有显著的表观减小。但是，这个效果不单是溶剂改变的效果，但将依賴于在使溶剂改变的透析过程中所必須发生的变性程度。

(潘筱平　譯)

参考文献

[1] Butler, J. A. V., Phillips, D. M. P. and Shooter, K. V. *Arch. Biochem. Biophys.* 1957, **71**, p. 367

[2] Butler, J. A. V., Laurence, D. J. R., Robins, A. B. and Shooter, K. V. *Nature, Lond.* 1957, **180**, p. 1340; *Proc. Roy. Soc. A* 1959, **250**, p. 1

[3] Svedberg, T. and Pedersen, K. O. *The Ultracentrifuge*: Clarendon Press, Oxford, 1940, p. 22

[4] Mandelkern, L., Krigbaum, W. R., Scheraga, H. A. and Flory, P. J. *J. chem. Phys.* 1952, **20**, p. 1392
See also Scheraga, H. A. and Mandelkern, L. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 179
Mandelkern, L. and Flory, P. J. *J. chem. Phys.* 1952, **20**, p. 212

[5] Tennent, H. G. and Vilbrandt, C. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1943, **65**, p. 424

[6] Cecil, R. and Ogston, A. G. *J. chem. Soc.* 1948, p. 1382

[7] Stern, K. G. and Atlas, S. M. *J. biol. Chem.* 1953, **203**, p. 795

[8] Kahler, H. J. *J. phys. Chem.* 1948, **52**, p. 676

[9] Ogston, A. G. *Trans. Faraday Soc.* 1950, **46**, p. 791

[10] Peacocke, A. R. and Schachman, H. K. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **15**, p. 198

[11] Kahler, H. J. and Shack, J. *J. phys. Chem.* 1957, **61**, p. 649

[12] Doty, P., McGill, B. B. and Rice, S. A. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*

1958, **44**, p. 432
[13] Kawade, Y. and Watanabe, I. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **19**, p. 513
[14] Oth, A. *Bull. Soc. chim. Belg.* 1955, **64**, p. 484
[15] Coates, J. H. and Jordan, D. O. *Biochim. biophys. Acta* 1959, **35**, p. 309
[16] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *Nature, Lond.* 1955, **175**, p. 500
[17] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, p. 734
[18] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 705
[19] Shooter, K. V. *Progr. Biophys.* 1957, **8**, p. 309
[20] Barbu, E., Joly, M., Robins, A. B. and Shooter, K. V. *Trans. Faraday Soc.* 1958, **54**, p. 1092
[21] Goodgal, S. H., Rupert, C. S. and Herriott, R. M. *Trans. Faraday Soc.* 1957, **53**, p. 257
[22] Butler, J. A. V. and James, D. W. F. *Nature, Lond.* 1951, **167**, p. 844
[23] Howard, G. J. *Thesis*, University of Nottingham, 1953
[24] Goates, J. H. *Thesis*, University of Adelaide, 1957
[25] James, D. W. F. *Thesis*, University of London, 1954 (quoted by Shooter, K. V., ref. 19)
[26] Pouyet, J. *C. R. Acad. Sci., Paris* 1952, **234**, p. 152
[27] Conway, B. E. and Butler, J. A. V. *J. Polym.Sci.* 1954, **12**, p. 199
[28] Jordan, D. O. and Porter, M. R. *Trans. Faraday Soc.* 1954, **50**, p. 301
[29] Reichmann, M. E., Rice, S. A., Thomas, C. A. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, p. 3047
[30] Eisenberg, H. *J. Polym. Sci.* 1957, **25**, p. 257
[31] Cavalieri, L. F., Rosoff, M. and Rosenberg, B. H. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 5239
[32] Mathieson, A. R. and Porter, M. R. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 288
[33] Shooter, K. V., Pain, R. H. and Butler, J. A. V. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **20**, p. 497
[34] Peterlin, A. and Signer, R. *Helv. chim. Acta* 1953, **36**, p. 1575
Peterlin, A. *J. Polym. Sci.* 1954, **12**, p. 45
[35] Wahl, R., Lee Ki Yong and Barbu, E. *Ann. Inst. Pasteur* 1957, **92**, p. 153
[36] Doty, P. and Bunce, B. H. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 5029
[37] Sadron, C., Pouyet, J. and Vendrely, R. *Nature, Lond.* 1957, **179**, p. 263
[38] Oster, G. *Trans. Faraday Soc.* 1950, **46**, p.794; *J. chem. Phys.* 1950, **47**, p. 717

[39] Smith, D. B. and Sheffer, H. *Canad. J. Res.* 1950, **28B**, p. 96
[40] Reichmann, M. E., Bunce, B. H. and Doty, P. *J. Polym. Sci.* 1953, **10**, p. 109
[41] Reichmann, M. E., Varin, R. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 3203
[42] Rice, S. A. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, p. 3937
[43] Brown, G. L., M'Ewen, M. B. and Pratt, M. I. *Nature, Lond.* 1955, **176**, p. 161
[44] Rowen, J. W., Eden, M. and Kahler, H. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **10**, p. 89
[45] Rowen, J. W. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **10**, p. 391
[46] Katz, S. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 2238
[47] Sadron, C. *Proceedings Third International Congress Biochemistry*, Brussels, 1955, p. 125
[48] Pouyet, J., Hermans, J. and Vendrely, R. *Trans. Faraday Soc.* 1957, **53**, p. 247
[49] Pouyet, J. and Weill, G. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 739
[50] Bütler, R. *Thesis*, University of Berne, 1953 (quoted by Sadron, Pouyet and Vendrely, ref. 37)
[51] Rowen, J. W. and Norman, A. *Arch. Biochem. Biophys.* 1954, **51**, p. 524
[52] Alexander, P. and Stacey, K. A. *Biochem. J.* 1955, **60**, p. 194
[53] Doty, P. *Proceedings Third International Congress Biochemistry*, Brussels, 1955, p. 135
[54] Northrop, R. G., Nutter, R. L. and Sinsheimer, R. L. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 5134
[55] Benoit, H. *J. Polym. Sci.* 1953, **11**, p. 507
[56] Doty, P. *J. cell. comp. Physiol.* 1957, **49**, Supplement No. 1, p. 27
[57] Schachman, H. K. *J. cell. comp. Physiol.* 1957, **49**, Supplement No. 1, p. 71
[58] Steiner, R. F. *Trans. Faraday Soc.* 1952, **48**, p. 1185
[59] Fluke, D., Drew, R. and Pollard, E. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1952, **38**, p. 180
[60] Jordan, D. O. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 447
[61] Signer, R., Caspersson, T. and Hammarsten, E. *Nature, Lond.* 1938, **141**, p. 122
[62] Perrin, F. *J. Phys. Radium* 1936, **7**, p. 1
[63] Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 747

[64] Simha, R. *J. Phys. Chem.* 1940, **44**, p. 25
[65] Perrin, F. *J. Phys. Radium* 1934, **5**, p. 497
[66] Goldstein, M. and Reichmann, M. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, p. 3337
[67] Oster, G. *Trans. Faraday Soc.* 1950, **46**, p. 794
[68] Flory, P. J. and Fox, T. G. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1904
[69] Schwander, H. and Cerf, R. *Helv. chim. Acta* 1949, **32**, p. 2356
[70] Schwander, H. *J. chem. Phys.* 1950, **47**, p. 718
[71] Peterlin, A. *Makromol. Chem.* 1953, **9**, p. 244
[72] Peterlin, A. *J. Polym. Sci.* 1953, **10**, p. 425
[73] Peterlin, A. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 259
[74] Kratky, O. and Porod, G. *Proc. Int. Coll. Macromol.* Amsterdam. 1949, p. 250
[75] Sadron, C. *Progr. Biophys.* 1953, **3**, p. 237
[76] Kurucsev, T.—unpublished results
[77] Signer, R. and Schwander, H. *Helv. chim. Acta* 1949, **32**, p. 853
[78] Creeth, J. M., Gulland, J. M. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1947, p. 1141
[79] Greenstein, J. P. and Jenrette, W. V. *J. nat. Cancer Inst.* 1940, **1**, p. 77
[80] Vallet, G. and Schwander, H. *Helv. chim. Acta* 1949, **32**, p. 2508
[81] Gulland, J. M., Jordan, D. O. and Taylor, H. F. W. *J. chem. Soc.* 1947, p. 1131
[82] Jordan, D. O. *Progr. Biophys.* 1951,**2**, p. 51
[83] Conway, B. E. and Butler, J. A. V. *J. Polym. Sci.* 1953,**11**, p. 277
[84] Butler, J. A. V., Conway, B. E. and James, D. W. F. *Trans. Faraday Soc.* 1954, **50**, p. 612
[85] Jordan, D. O. and Porter, M. R.—unpublished results
[86] Geiduschek, E. P. *Thesis,* University of Harvard, 1951 (quoted by Reichmann, Varin and Doty, ref. 41)
[87] Oth, A. and Doty, P. *J. phys. Chem.* 1951, **56**, p. 43
[88] See also Alexander, P. and Stacey, K. A. *Trans. Faraday Soc.* 1955, **51**, p. 299
[89] Snellman, O. and Widström, G. *Ark. Kemi Min. Geol.* 1945, **A19**, No. 31
[90] Schwander, H. and Cerf, R. *Helv. chim. Acta* 1951, **34**, p.436
[91] Schwander, H. and Cerf, R. *Experientia* 1951, **7**, p. 95
[92] Schwander, H. and Signer, R. *Helv. chim. Acta* 1951, **34**, p. 1344
[93] Cerf, R. *J. Polym. Sci.* 1954, **12**, p. 15

[94] Horn, P., Leray, J., Pouyet, J. and Sadron, C. *J. Polym. Sci.* 1952, **9**, p. 531
[95] Scott, J. F. *Biochim. biophys. Acta* 1948, **2**, p. 1
[96] Bayley, S. T. *Nature, Lond.* 1951, **168**, p. 470
[97] Backus, R. C. and Williams, R. C. *J. appl. Phys.* 1950, **21**, p. 11
[98] Williams, R. C. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **9**, p. 237
[99] Williams, R. C. (quoted by Shooter, ref. 19)
[100] Schuster, H. von, Schramm, G. and Zillig, W. *Z. Naturf.* 1956, **11b**, p. 339
[101] Hall, C. E. *J. biophys. biochem. Cytol.* 1956, **2**, p. 625
[102] Hall, C. E. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1956, **42**, p. 801
[103] Hall, C. E. and Litt, M. *J. biophys. biochem. Cytol.* 1958, **4**, p. 1
[104] Dekker, C. A. and Schachman, H. K. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1954, **40**, p. 894
[105] Hall, C. E. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 1269
[106] Cosgrove, D. J. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1413
[107] Lee, W. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1951, p. 3361
[108] Jordan, D. O., Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 154
[109] Peacocke, A. R. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 157
[110] Cox, R. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1956, p. 2499
[111] Peacocke, A. R. Special Publication No. 8, The Chemical Society, London, 1957
[112] Lee, W. A. and Peacocke, A. R. *Research, Lond.* 1953, **6**, p. 158
[113] Katchalsky, A., Shavit, N. and Eisenberg, H. *J. Polym. Sci.* 1954, **13**, p. 69
[114] Mathieson, A. R. and McLaren, J. V. *J. chem. Soc.* 1956, p. 303
[115] Peacocke, A. R. and Lifson, S. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **22**, p. 191
[116] Shack, J. and Thompsett, J. M. *J. biol. Chem.* 1952, **197**, p. 17
[117] Hill, T. L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1955, **57**, p. 229
[118] Jordan, D. O., Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 158
[119] Cavalieri, L. F. and Stone, A. L. *J. Amer. chem. Soc.* 1955, **77**, p. 6499
[120] Hurlen, E., Laland, S. G., Cox, R. A. and Peacocke, A. R. *Acta chem. Scand.* 1956, **10**, p. 793
[121] Hurst, R. O., Marko, A. M. and Butler, G. C. *J. biol. Chem.* 1953, **204**, p. 847
[122] Cox, R. A. and Peacocke, A. R.—unpublished results (quoted by Peacocke, A. R., ref. 111)

[123] Pauling, L. and Corey, R. B. *Arch. Biochem. Biophys.* 1956, **65**, p. 164
[124] Cox, R. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1957, p. 4724
[125] Vandendriessche, L. *C. R. trav. Lab. Carlsberg* 1951, **27**, No. 15, p. 341
[126] Wyman, J. *J. biol. Chem.* 1939, **127**, p. 1
[127] Creeth, J. M. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1409
[128] Shack, J., Jenkins, R. J. and Thompsett, J. M. *J. biol. Chem.* 1952, **198**, p. 85
[129] Stenhagen, E. and Teorell, T. *Trans. Faraday Soc.* 1939, **35**, p. 743
[130] Seibert, F. B. *J. biol. Chem.* 1940, **133**, p. 593
[131] Hall, J. L. *J. Amer. chem. Soc.* 1941, **63**, p. 794
[132] Cohen, S. S. *J. biol. Chem.* 1942, **146**, p. 471
[133] Creeth, J. M., Jordan, D. O. and Gulland, J. M. *J. chem. Soc.* 1949, p. 1406
[134] Abramson, H. A., Moyer, L. S. and Gorin, M. H. *Electrophoresis of Proteins*: Reinhold, New York, 1942
[135] Inman, R. B. and Jordan, D. O. *Biochem. Biophys. Acta*—in press
[136] Huizenga, J. R., Grieger, P. F. and Wall, F. T. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 2636
[137] Inman, R. B.—unpublished result
[138] Blout, E. R. and Asadourian, A. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **13**, p. 161
[139] Frick, G. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **8**, p. 625
[140] Lawley, P. D. *Thesis*, University of Nottingham, 1953
[141] Chargaff, E. and Zamenhof, S. *J. biol. Chem.* 1948, **173**, p. 327
[142] Commoner, B. *Science* 1949, **110**, p. 31
[143] Lawley, P. D. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **21**, p. 481
[144] Michelson, A. M. *Nature, Lond.* 1958, **182**, p. 1502
[145] Thomas, R. *Bull. Soc. Chim. biol.*, Paris 1953, **35**, p. 609
[146] Laland, S. G., Lee, W. A., Overend, W. G. and Peacocke, A. R. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 356
[147] Thomas, R. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 231
[148] Shack, J., Jenkins, R. J. and Thompsett, J. M. *J. biol. Chem.* 1953, **203**, p. 373
[149] Cavalieri, L. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 1242
[150] Stern, K. G. and Steinberg, M. A. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **11**, p. 553
[151] Zubay, G. and Doty, P. *Biochim. biophys. Acta* 1958, **29**, p. 47
[152] Bank, O. and Bungenberg de Jong, H. G. *Protoplasma* 1939, **32**, p. 489
[153] Michaelis, L. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1947, **12**, p. 131

[154] Michaelis, L. and Granick, S. *J. Amer. chem. Soc.* 1945, **67**, p. 1212
[155] Lawley, P. D. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **19**, p. 328
[156] Massart, L., Coussens, R. and Silver, M. *Bull. Soc. Chim. biol.*, Paris 1951, **33**, p. 514
[157] Weissman, N., Carnes, W. H., Rubin, P. S. and Fisher, J. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 1423
[158] Cavalieri, L. and Angelos, A. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 4686
[159] Cavalieri, L., Angelos, A. and Balis, M. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 4902
[160] Irvin, J. L. and Irvin, E. M. *J. biol. Chem.* 1954, **206**, p. 39
[161] Lawley, P. D. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **19**, p. 160
[162] Lawley, P. D. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **22**, p. 451
[163] Peacocke, A. R. and Skerrett, J. N. H. *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, p. 261
[164] Heilweil, H. G. and van Winkle, Q. *J. phys. Chem.* 1955, **59**, p. 939
[165] Oster, G. *Trans. Faraday Soc.* 1951, **47**, p. 660
[166] Morthland, F. W., de Bruyn, P. P. H. and Smith, N. H. *Exp. Cell Res.* 1954, **7**, p. 201
[167] Kurnick, N. B. *J. Amer. chem. Soc.* 1954, **76**, pp. 417, 4040
[168] Hammarsten, E. *Biol. Zbl.* 1924, **144**, p. 383
[169] Bjørnesjø, K. B. and Teorell, T. *Ark. Kemi Min. Geol.* 1945, **A19**, No. 34
[170] Przylecki, S. J. and Grynberg, M. Z. *Biochem. Z.* 1933, **258**, p. 389
[171] Goldwasser, E. and Putnam, F. W. *J. phys. Chem.* 1950, **54**, p. 79
[172] Greenstein, J. P. and Jenrette, W. V. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1941, **9**, p. 236
[173] Geiduschek, E. P. and Doty, P. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **9**, p. 609
[174] Alexander, P. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **10**, p. 595
[175] Geiduschek, E. P. and Gray, I. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 879
[176] Coates, J. H. and Jordan, D. O. *Biochim. biophys. Acta*—in press

第十一章　核酸的結构(四)
脫氧戊糖核酸的变性和降解

引　　言

在天然脫氧戊糖核酸分子中存在着两种主要类型的化学鍵。大分子結构的一般特性均与这些化学鍵有关。这两种类型的鍵就是形成多核苷酸单鏈的核苷酸間的共价的多酯鍵和連結着两条不同多核苷酸鏈中的嘌呤和嘧啶环系間的氫鍵，这些氫鍵产生并稳定着双螺旋結构。因此，天然脫氧戊糖核酸的分解可因断裂氫鍵、共价鍵或同时破裂这两种类型的鍵而产生。与蛋白质中所发生的过程相似，因为氫鍵的断裂一般不发生分子量的改变，因此氫鍵的断裂称为变性[1~3]。如果所有的氫鍵完全断裂，則可能为完全变性，不过变性往往是不完全的，而且在某些条件下变性是可逆的。多核苷酸鏈中共价鍵的破裂，不論有沒有伴随着氫鍵的断裂，总是一个比較剧烈的不可逆的过程，因此一般称为降解。为了方便起見，特将天然脫氧戊糖核酸的这两种分解过程分别加以討論。

脫氧戊糖核酸的变性

Gulland、Jordan 和 Taylor[4] 首先观察到脫氧戊糖核酸經酸或碱处理后就不再产生天然脫氧戊糖核酸所特有的异常滴定曲綫(参看第九章)。参預形成氫鍵的基团的电离，即嘌呤碱和嘧啶碱的氨基和—NH—CO—的解离，能够使多核苷酸鏈产生某些分离，这些分离在 pH 7 的溶液中只能部分地恢复。因此 Cosgrove 和 Jordan[5~7] 指出，加热后的脫氧戊糖核酸溶液亦不产生异常的滴定曲綫。最近 Thomas[3,8] 指出，脫氧戊糖核酸溶液在 259 mμ 处

的紫外吸收的不可逆增加不仅发生在使溶液受热时和 pH 在极限时，而且也发生在将外加电解质的濃度降低到低于某一临界值时(若外加电解质为氯化鈉则为 10^{-3} 至 $10^{-4}M$，若为氯化鎂則为 10^{-5} 至 $10^{-6}M$)。Inman 和 Jordan[9] 也指出，当相当濃的脫氧戊糖核酸盐溶液被稀釋至很低的濃度时，也有类似的結果。某些試剂，象已知能够断裂氫鍵的尿素，也能使脫氧戊糖核酸变性。因此，显然有四种方法可以使脫氧戊糖核酸发生变性，那就是将其溶解在純水或非常稀的电解质溶液中、用非常强的酸溶液或碱溶液处理、加热以及采用能够使氫鍵断裂的試剂。現在将这四种方法詳細加以討論。

溶解在水中或稀电解质溶液中的变性

結构的改变对脫氧戊糖核酸溶液在 259 mμ 处的紫外吸收的改变非常灵敏。象在第十章(225 頁)已經討論过，天然脫氧戊糖核酸鈉在 259 mμ 处的 $\epsilon(P)$ 值远低于一个理論核苷酸混合物的計算值。因热、酸或碱引起的变性已知其能使 $\epsilon(P)$ 值增加。但是，只有用水解使进一步降解到核苷酸和核苷后才能产生一个接近于理論的数值。

Thomas[3,8] 观察到若将原先溶解在相当濃的电解质溶液中的脫氧戊糖核酸溶液的电解质濃度降低，但保持核酸濃度不变，则发生 $\epsilon(P)$ 值的增加，其数值与从热变性所得到的数值相似。并且也观察到这个过程是不可逆的；加电解质到原来已溶解于水的或非常稀的电解质溶液的脫氧戊糖核酸溶液中虽可降低其 $\epsilon(P)$ 值，但不能降低到原来天然核酸盐的数值。这种性质在图 63 中說明。图中表示出光密度随着氯化鈉和硫酸鎂濃度的改变。原来的天然脫氧戊糖核酸是溶解在 $1M$ 氯化鈉溶液中的。在稀釋氯化鈉濃度到接近 $10^{-3}M$ 以前光密度不变。当氯化鈉濃度被稀釋至 $10^{-4}M$ 左右时，光密度增加至一极大值，大約較原来数值大 25%。增加氯化鈉濃度至开始濃度时产生光密度的降低，但降低后的数值仍較开始的数值高 11% 左右。这种不能再得到原来那样低的光密度

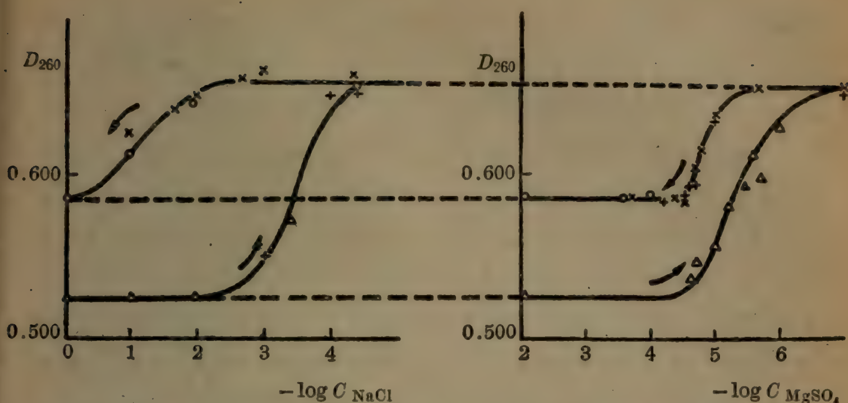


图 63 因降低或增高电解质濃度的脫氧戊糖核酸溶液在 260 mμ 处的光密度的改变
(R. Thomas: *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, 233 頁)

值的事实使 Thomas[3,8] 得出这样的結論，即已經发生了不可逆变性。

脫氧戊糖核酸的不可逆变性能够用将核酸溶解在純水或低于某一临界电解质濃度的溶液中来实現这一观察意味着当从組織中提取脫氧戊糖核酸时必須十分注意防止溶液到达可以产生这样变性的条件。脫氧戊糖核酸样品的光密度或 $\epsilon(P)$ 值还可以作为因任何特殊处理或在制备过程中所发生变性的程度的指标。这个制备脫氧戊糖核酸的滿意制品的标准是由 Chargaff[10] 首先提出的(参看第二章 13 頁)。已經記录在文献中的眞正未变性的天然核酸制品在 259 mμ 处的 $\epsilon(P)$ 最低值从 6000 改变至 7500，虽然大多数的 $\epsilon(P)$ 值是在 6300 至 6600 的較狹的范圍之內。Inman 和 Jordan[11] 从小牛胸腺脫氧戊糖核酸的五个不同制品的仔細研究結果得到的数值为 6657，其他的数值是在 6613 与 6705 之間。象在第二章(14 頁)中所述的，可以认为在 259 mμ 处的 $\epsilon(P)$ 值 6600 是指天然核酸制品的 $\epsilon(P)$ 值。

从图 63 中所載的 Thomas[8] 的实驗数据可以明了，不同电解质对脫氧戊糖核酸溶液光密度的影响是相似的；从脫氧戊糖核酸的氯化鈉和硫酸鎂溶液中除去或加入电解质所得到光密度的极限

值皆相同。但是,对含有二价阳离子的溶液来讲,引起变性的极限濃度远低于含有一价阳离子的溶液,其数值分别为 $10^{-4.5} \sim 10^{-6}M$ 和 $10^{-3} \sim 10^{-4}M$(原文数值前后相反,已改正——譯者)。

Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 曾研究了这个变性方法的机制,他們的研究結果証实了,并大大推广了 Thomas 的实験。降低电解质濃度时光密度的增高与脱氧戊糖核酸鈉的濃度有关(参看图 64);这几乎可以肯定是由于核酸盐反离子对离子强度所发生的作用,也可能是由于在制备过程中从氯化鈉溶液中沉淀脱氧戊糖核酸鈉时存在有少量殘余的氯化鈉的緣故。对变性机制的解

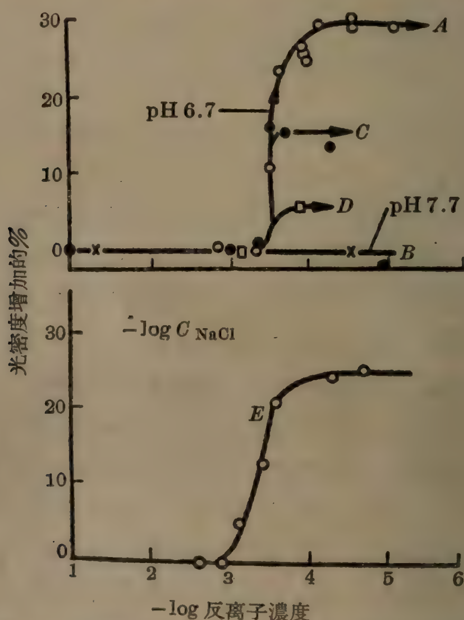


图 64 在中性溶液中 (pH 6.5～7) 当盐濃度降低时脱氧核糖核酸鈉溶液的光密度的增高

曲綫 A 和 B, 0.017×10^{-3} g/ml; 曲綫 C, 0.12×10^{-3} g/ml; 曲綫 D, 0.25×10^{-3} g/ml。曲綫 B 表示在 pH 7.7 时降低盐濃度的影响。在曲綫 E 中每一点都代表当不同濃度核酸盐 ($0.75\times10^{-3}\sim0.0069\times10^{-3}$ g/ml) 与水接触时的光密度增高对反离子濃度作图(摘自 L. F. Cavalieri、M. Rosoff 和 B. H. Rosenberg: *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, 5242 頁)

釋具有重要意义的是 Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 的观察，即若将脱氧戊糖核酸鈉溶解于 pH 8～9 的水中使所成的溶液的 pH 变为近于 7.5～8 时，則脱氧戊糖核酸鈉不会发生变性。虽然 Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 沒有說明怎样取得这样的‘水’，但是可以推測到这样的‘水’是由加入极微量的氫氧化鈉于除去离子的蒸餾水中而制得的。制成一个近于 $10^{-5}M$ 的氫氧化鈉溶液可使水的 pH 由 7 变为 9，这一濃度远小于 1-1 价离子的电解质防止变性所需的临界濃度，因此断定在 pH 7.5 时沒有发生变性是由于 pH 改变的影响，而不是由于离子强度的微小改变所致。向 pH 7.5 的核酸盐溶液中加入酸可以产生两个明显的光譜升高，一个在 pH 7，另一个在 pH 4.5（图 65）。比較图 65 中的 A 和 B 两条曲綫（它們是在无氯化鈉和 $10^{-3}M$ 氯化鈉的溶液中得到的）时指出曲綫 A 中的两个不同的組〔A(1) 和 A(2)〕都参与光譜的变化，一組〔A(2)〕对离子强度的关系很大，另一組〔A(1)〕則很少受到电解质存在的影响。Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 曾对这些結果作

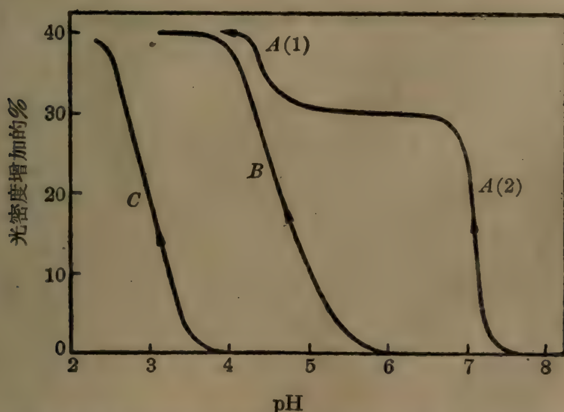


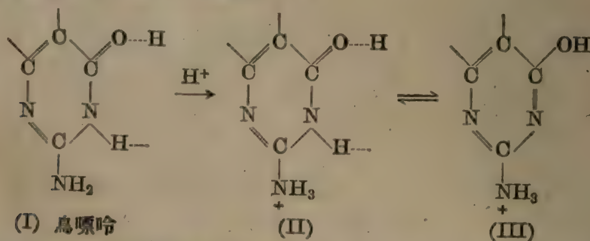
图 65 脱氧核糖核酸的光譜滴定。光密度的增高是以未变性的核酸为根据的〔$\epsilon(P)=6,300$〕

曲綫 A 是在水中测得的；曲綫 B 和 C 分别在 10^{-3} 和 $0.2M$ 氯化鈉中测得的

(L. F. Cavalieri、M. Rosoff 和 B. H. Rosenberg: *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, 5242 頁)

了解釋，认为除去电解质所产生的变性与酸变性相似(参看后面)，是质子加到脫氧戊糖核酸盐的碱基中的結果。这些碱基被鉴定为嘌呤碱和嘧啶碱的氨基，在正常情况下它們的 pK_a' 值在3～5.5范圍內(参看表18，214頁)，但在低离子强度的溶液中与磷酸基团正常配对的反离子扩散脫离，留下裸露的磷酸基团，这些基团产生强电場效应。根据 Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg 的观察，这些基团会使氨基的 pK_a' 值升高至約 pH 7。这些数值与列在表18中(214頁)的不相符合。表18中的数值表示出在离子强度为零时的最弱的氨基为胞嘧啶的氨基，其 pK_a' 值为5.25。但是，必須回忆一下，这些数值是从将在相当高的离子强度下得到的数值外推至无限稀釋时所得到的。在这些离子强度下，这里所考虑的电場效应并不发生效力。因此很有理由可以认为由裸露的磷酸基团所产生的电場效应能够产生这样大的 pK_a' 值的移动。

Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 用这样的假定，即几个脫氧戊糖核酸盐的双螺旋結构纏繞在一起形成一个紧密的聚集体，因而在聚集体中心的磷酸基团所結合的反离子不易扩散脫离来解釋涉及两种类型氨基(即图65中在曲綫 *A* 上的滴定范圍1和2)的观察[13]。因此这些磷酸基团沒有解离，不能对邻近的氨基产生电場效应，因而这些氨基沒有 pK_a' 轉移。Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 认为有 pK_a' 轉移的基团是鳥嘌呤的氨基，pK_a' 从2.5轉移到7。因此这些研究者描述变性的机制为质子加在鳥嘌呤的氨基上，結果破坏了邻近的氫鍵[12]：



但是，根据脫氧戊糖核酸的随意聚集，現在尚不清楚为什么鳥嘌呤的氨基应为唯一的受电場效应影响的基团；为什么因为一个质子

加入到鳥嘌呤氨基上就一定会发生上述的最后的变性过程 (II)→(III)也不清楚。另一个解釋可能是参与形成多核苷酸間氫鍵的胞嘧啶和胸腺嘧啶的氨基对质子的加入亦有关系，以及所有的氨基的 pK'_a 值是受着电場效应影响而发生轉移，这些电場效应由于在低离子强度下裸露的磷酸基团的存在而变为有效。如果在以氫鍵結合的結构中胞嘧啶和胸腺嘧啶的氨基在低离子强度下的 pK'_a 接近于7，则在 pH 7 的純水中这些氨基将有一半被中和，結果使氫鍵断裂和分子变性。

在沒有加入任何电解质的情况下，脱氧戊糖核酸盐的变性亦可因本身的稀釋而发生。如果将脱氧戊糖核酸鈉溶解在水中使成相当濃的溶液，则由于反离子的濃度高而不发生变性。当稀釋进行时，与磷酸基团結合的反离子‘解离’，并扩散离去，而留下完全带电的磷酸基团。于是变性继續进行，其方式与除去电解质时的变性相似。Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 观察了这个过程，这个过程可以从图 64 下图的曲綫得到了解。这个曲綫指出当反离子濃

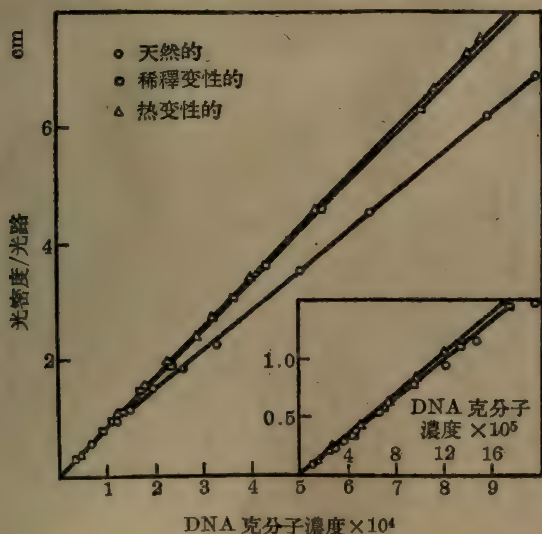


图 66 脱氧戊糖核酸鈉的光密度随着濃度的变化

(R. B. Inman 和 D. O. Jordan: *Biochim. biophys. Acta*, 在印刷中)

度(因此也就是核酸盐濃度)达到一个特殊值时，光密度明显地增加。这一观察可能是 Pouyet、Schiebling 和 Schwander[14]所首先得到的。Dhaussy[15]也进行过这样的观察，他发現在有关光密度随着核酸盐濃度变化的曲綫上有一个轉折点。Inman 和 Jordan[9]研究了这个变性过程，发現不仅在光密度随着濃度变化的曲綫上有轉折点(图 66)，而且在电导随着濃度变化的曲綫上也有轉折点(图 67)。这两个轉折点都出現在相同濃度的范圍內。稀釋到低于这个临界濃度时在脫氧戊糖核酸盐內产生了不可逆变化。Inman 和 Jordan 认为这个变化就是变性过程，因为脫氧戊糖核酸盐在临界濃度下的行为与热变性的核酸盐的行为相同(图 66 和 67)。

在高度稀釋时，脫氧戊糖核酸盐离子上的电荷分数(每克原子磷的电荷)显著增加(图 53，223 頁)，因此根据磷酸基团电荷所产生的高的静电場使氨基的 pK_a' 值轉移的机制可以适用，这一机制

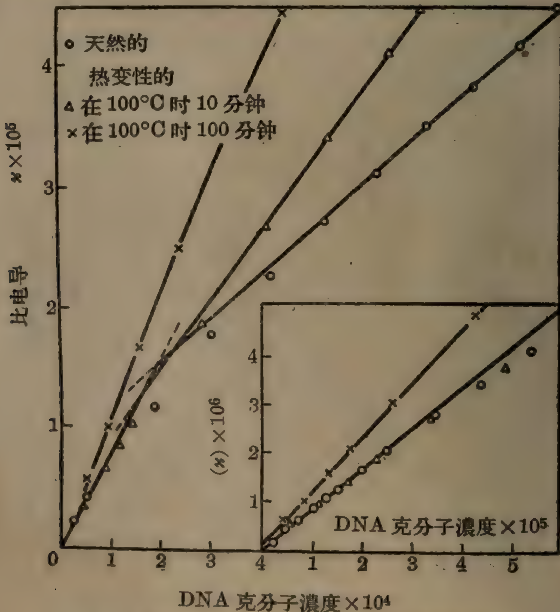


图 67 脫氧戊糖核酸鈉的电导随着濃度的变化

(R. B. Inman 和 D. O. Jordan: *Biochim. biophys. Acta*, 在印刷中)

与 Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 所建議的用以解釋降低离子强度时所产生的变性的机制相似。但是，与其认为变性的机制是涉及鳥嘌呤的氨基与水之間的一个质子的变換反应，Inman 和 Jordan 宁可考虑具有氫鍵結构的水爭取核酸盐上氫鍵位置的机制。

不論特殊氫鍵被破坏的确切机制究竟如何，显然从流动二色性 (flow dichroism)[12,16] 和紫外吸收[17]的研究可以知道变性的分子缺乏原来脫氧戊糖核酸的次序。这个次序的消失是由一些氫鍵破坏后两个多核苷酸鏈的某些部分分开，然后这两条柔性的单鏈重新排列成为嘌呤环和嘧啶环不再平行的构型的結果。并且氫鍵破坏后分子量并沒有改变[12]。而且除将溶液高度稀釋外，从光散射测得的均方末端距亦沒有多大改变[12]。但是，特性粘数則随着用水稀釋所发生的变性程度的增加[12]而下降，并且在光密度开始升高以前，分子变得更柔軟。

酸碱变性

Gulland、Jordan 和 Taylor[4] 与 Greeth、Gulland 和 Jordan[18] 首先观察到酸和碱能使脫氧戊糖核酸产生不可逆变化。将脫氧戊糖核酸在 25°C 时在 pH 2.5 和 11.5 下处理，发現滴定曲綫和粘度都产生显著的改变（参看图 36，172 頁；图 37，173 頁），而当溶液的 pH 恢复至 7 时，其原来的滴定性质和粘度都不能恢复。这些結果可用連接不同多核苷酸鏈間的氫鍵結构来解釋。了解酸碱处理后是否对分子量产生变化与这个原理有密切的关系，但 Cecil 和 Ogston[19] 与 Vilbrant 和 Tennent[20] 的早期沉降和扩散研究对这一点并沒有得出結論。应用广泛接受的 Watson 和 Crick 的脫氧戊糖核酸模型能使滴定的解釋和在分子的基础上研究分子的大小和形状变为可能，并具有較大的意义。

研究脫氧戊糖核酸的酸变性和碱变性的一个困难就是长时間的酸和碱的处理，特别是强酸和强碱的处理亦能导致分子的降解。因此，在可能的情况下必須用实驗方法区别这两个过程。象原先

所进行的那样，将濃試剂滴加到脫氧戊糖核酸溶液中以改变其 pH，必然会产生一些降解；但是象 Reichmann、Bunce 和 Doty[21] 所首先指出的，将脫氧戊糖核酸溶液对較高或較低 pH 的溶液进行透析，可以使 pH 緩慢地而不太剧烈地改变。应用这个方法，Reichmann、Bunce 和 Doty[21]，Thomas 和 Doty[22]，Schachman[23] 以及 Coates[24] 曾研究过用酸处理时分子的大小和形状的改变，而 Ehrlich 和 Doty[25] 則研究过用碱处理时的相似的改变。在支持 Reichmann、Bunce 和 Doty 的观察时 Alexander 和 Stacey[26] 的光散射研究是用直接加酸到不含有电解质的溶液中，使溶液的 pH 变为 2.2；因此酸处理的控制是比較不严密的，它不仅产生了变性，同时也产生了降解。

当在 0.2M 氯化鈉中进行透析使 pH 逐漸降低至 2.6 时，分子量并沒有改变，但是脫氧戊糖核酸盐离子則有明显的收縮[21,26]。从光散射测定的結果所計算出来的均方半徑在 pH 6.5、3.0 和 2.6 时分别为 2050Å、1770Å 和 880Å[21]。因此在 pH 3.0 时核酸盐离子有显著的收縮，在 pH 2.6 时收縮变得非常明显，此时离子的体积約为在 pH 6.5 时的十二分之一。从光散射测定的結果計算出的体积变化反映在随着 pH 变化的粘度变化上[27~29]（参看图 37，173 頁）。当 pH 降低至約 3.7 以前，特性粘数一直保持在溶液在 pH 7 时的正常高数值，但当 pH 降低到 3.7 与 2.8 之間时特性粘数急剧下降（Thomas[29] 所观察到的急剧下降在 pH 3.2 与 2.6 之間）。将核酸盐离子与碱接触亦得到类似的結果[25,27]。Ehrlich 和 Doty[25]的研究結果表明，从光散射的研究結果所計算出来的均方半徑从 pH 7 时（离子强度为 0.165）的 2600Å 降到 pH 12 时的 950Å，这表示分子的形状和体积的改变与发生在酸中时的情况非常相似，正象上面均方半徑数值所指出的一样。当 pH 增高至 12 时，特性粘数同样保持在在中性溶液中时的正常高数值，然后卽急剧下降[25,27]（图 37）。在酸性或碱性溶液中的相同狭窄极限 pH 范圍内所发生的脫氧戊糖核酸溶液的其他物理性质的突然改变是流动双折射的消失[18,27]（图 38，173 頁）、在 259 mμ 处紫外吸收的增

高(图 55, 226 頁)以及光学二色性(optical dichroism)的降低[12]。

对这种行为的解释最容易被人們接受的是：当酸或碱的濃度增加到某一点时，参与氫鍵結构的酸碱基团与所加入的酸或碱进行质子交換。但是，在所指出的 pH 范圍內，幷非所有的基团都能被滴定，其結果是某些氫鍵仍保持完整。离开完整的氫鍵区域，多核苷酸鏈能够自由地取得随意卷曲的和柔軟的构型，結果使脱氧戊糖核酸盐离子有显著的全部收縮幷增加其柔性[12,30]。

变性过程之是否可逆决定于使两个多核苷酸鏈保持两面位置正对所必須保留的未被断裂的氫鍵的比例，以致在中和时原来的氫鍵能重新形成。幷且，变性过程的可逆性不一定都是指原来的天然脱氧戊糖核酸已經重新形成，因为在中和时，氫鍵重新形成的形式幷不象原来天然核酸那样的特殊。有关变性过程中的可逆性和氫鍵破坏比例的知識大部分都是从电位滴定和溫度对酸-碱变性影响的研究得到。

Cox 和 Peacocke[31,32] 曾研究了从降低 pH 至正向滴定上的不同的选擇值再滴回至中性所得到的滴定曲綫，因而就能够估計出为着使变性不可逆所必須断裂氫鍵的比例。用小心加酸幷攪拌的方法，在 25°C 时将在 0.05M 氯化鈉中的脱氧戊糖核酸溶液的 pH 从中性降低到不同的点，卽正向滴定曲綫上的 E′ 和 E (图 68)，然后用碱进行反滴定，卽得到在正向滴定曲綫 APD 与逆向滴定曲綫 DRA 之間的一組滴定曲綫(图 68)。只有在所加的酸相当于每 4 克原子磷不超过 0.2 当量时(卽滴定至 E′，图 68)，逆向滴定曲綫都能与正向滴定曲綫重合。这就是說，在 25°C 时，最初 10% 的氫鍵結合的氨基的电离是可逆的；同时也暗示出只要大部分氫鍵沒有被破坏，就滴定研究所测知的脱氧戊糖核酸仍可以恢复到原来的天然状态。氨基电离超过这个临界比率时，脱氧戊糖核酸卽产生永久性的变化，而酸滴定超过 E′ 点时卽导致逆向滴定曲綫与正向滴定曲綫不能重合。因此只要滴定不超过 E，正向滴定到 E (图 68)就会产生逆向滴定曲綫 EFA，这是部分变性的脱氧戊糖核酸的可逆特性。

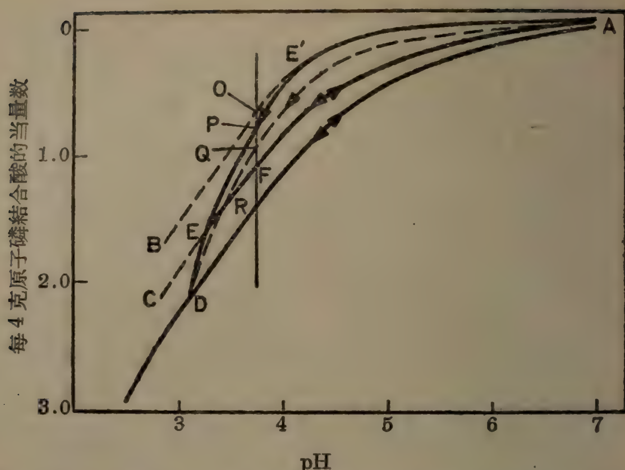


图 68 在 25°C 时,在 0.05M 氯化鈉溶液中的脫氧戊糖核酸鈉的滴定曲綫
APED 为用酸滴定的不可逆正向滴定曲綫; EFA, DRA 为用碱从 E 和 D 开始的可逆的逆向滴定曲綫; AOB 为以氫鍵結合的双螺旋結构的可逆滴定曲綫(即未变性的脫氧戊糖核酸); AQD 为 25% 酸变性的核酸盐的正向滴定曲綫
(R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, 766 頁)

除非滴定継續至更低的 pH 值[34],在 0°C 或接近 0°C 时,用酸滴定天然脫氧戊糖核酸的正向滴定曲綫不产生相当于在較高温度时所观察到的大量变性[31~33]。这个观察使 Cox 和 Peacocke[31]认为一个天然的、以氫鍵結合的脫氧戊糖核酸的理論可逆滴定曲綫可以从随着温度变化的滴定曲綫改变的研究計算出来。从一个已經在 0.4°C 时滴定到 pH 3,然后再滴回到中性的脫氧戊糖核酸样品,在 25°C 的滴定与完全变性的脫氧戊糖核酸的曲綫相比时曾估計出經在 0.4°C 时的滴定循环后,尙有 60% 的氫鍵未被破坏。从这个結果得到代表天然脫氧戊糖核酸的理論可逆滴定曲綫 AOB (图 68)。一旦知道了天然和变性的脫氧戊糖核酸的可逆滴定曲綫(图 68 中的 AOB 和 AD),就有可能从任何中間的可逆滴定曲綫中例如 AFE 中的位置計算出氫鍵不可逆破坏的比数(β),因为 OF/OR$=\beta$,其中 O 和 R 分別为在同一 pH 时的天然的和变性的滴定曲綫上的点,犹如在 AFE 上的任何 F 点。在各种不同温度

下的正向滴定中的氫鍵不可逆破坏的比数(β)的改变与結合酸的量的关系表示在图 69。虛綫表示如果每个基团在变性过程中永久失去氫鍵时所預期得到的关系。显然,在給定电离度时,变性大小是由温度所决定。在 25°C 时,当結合酸的当量为 0.0~0.2 时,β 为零;但 β 值卽随結合酸的增加而增加,直到結合酸的当量为 1.9~2.2 时,β 值直綫上升至 1。在 35°C 时,曲綫更陡,而当結合酸的当量为 1.86 时,卽得到完全的变性($\beta=1$)。在 0.4°C 下,当結合酸的当量低于 2.2 时,β 不超过 0.4,而在 −0.75°C 时,根据 Peacocke 和 Preston[33] 的观察,β 保持在零。

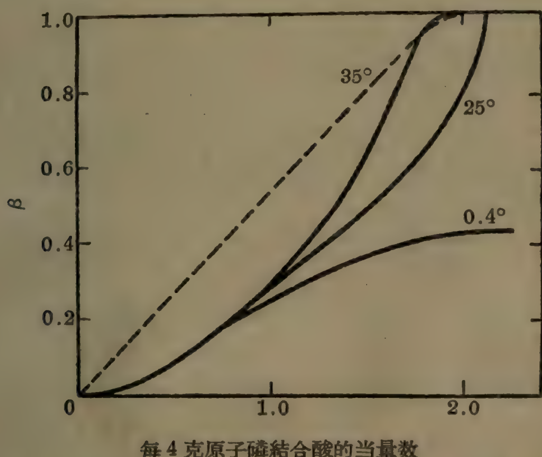


图 69 在不同温度下氫鍵不可逆破坏比数(β)的改变与脫氧戊糖核酸鈉的結合酸的量的关系;虛綫表示如果每一个氫鍵在变化过程中都是不可逆时所預期得到的关系

(R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, 772 頁)

在不同温度下,脫氧戊糖核酸的酸滴定不仅决定于酸变性,而且也决定于热变性。因此用酸使脫氧戊糖核酸分子产生完全变性所必須破坏的氫鍵的临界数是温度的函数。Cavalieri 和 Rosenberg[34] 首先对这个事实加以完全贊許,他們与 Peacocke 和 Preston[33] 一样,在不同温度下进行了酸滴定,所得的結果表示在图 70。这些結果指出,在所有温度下都有一个共同的正向滴定曲綫

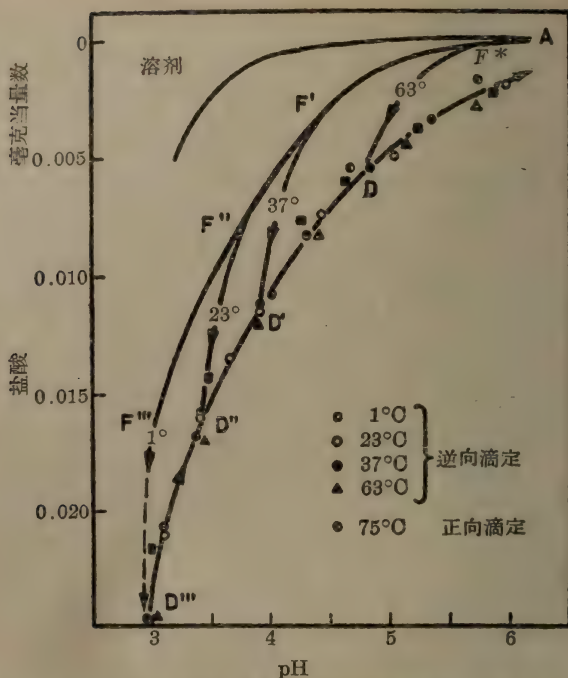


图 70　在不同温度下脫氧戊糖核酸鈉的酸滴定曲綫。曲綫上每一个不同的点都代表一个温度。在 75°C 时的正向滴定曲綫相当于在較低温度时的逆向滴定曲綫(为作图方便起見曾将在 1°C 时的正向滴定曲綫的虛綫部分向上移)

(摘自 L. F. Cavalieri 和 B. H. Rosenberg: *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, 5354 頁)

和逆向滴定曲綫，这些曲綫是分别指天然的与变性的脫氧戊糖核酸的可逆滴定曲綫，但是在正向滴定曲綫上的不可逆变性开始时的某一点与温度有关。这些結果与 Cox 和 Peacocke 所得的結果沒有什么不同，因为图 70 中的 F、F′ 等点相当于图 68 中的 E′，因此在这些轉折点前面的滴定曲綫是可逆的，而在它們后面的滴定曲綫是不可逆的。Jordan、Mathieson 和 Matty[37] 认为因为 pK'_a 值的温度系数小[34~36]，因此与温度无关的可逆正向滴定曲綫

* 原图上符号 F 遺漏(譯者注)

与逆向滴定曲綫間的差别是由于氨基 pK'_a 值的轉移，而以氫鍵結合的天然型脫氧戊糖核酸的氨基的 pK'_a 值較高。

但是，Cavalieri 和 Rosenberg[34] 的实驗結果对滴定結果的解釋有重要的意义。首先，Jordan、Mathieson 和 Matty[37] 所得到的氫鍵結合型的胞嘧啶和腺嘌呤的 pK'_a 值不正确，因为这些数值事实上是从 AF″D″ 类型的曲綫(图 70)計算出来的，在这个曲綫上仅 AF″ 部分与氫鍵結合的天然脫氧戊糖核酸的氨基的 pK'_a 值有关，而 F″D″ 部分是指氫鍵結合和非氫鍵結合的基团的混合物。其次，鉴于图 70 中所表示的酸变性与热变性的相互关系而联想到过去一般所得到的結論似乎是不健全的(参看第九章)，这个結論就是：加入約相当于每 4 克原子磷的 2 个当量酸后的正向滴定曲綫与逆向滴定曲綫相重合，因此鳥嘌呤氨基不参与氫鍵的形成。

脫氧戊糖核酸的酸变性和碱变性的机制明显地牽涉到质子加到参与氫鍵結构的酸-碱基团上，或从其中除去。这样就使氫鍵破坏和核酸变性，虽然 Sturtevant 和 Geiduschek[36] 在热函的变化与变性成正比的假定下，认为质子加到氨基的过程并不一定表示氫鍵的破坏。Cavalieri 和 Rosenberg[38] 与 Cavalieri、Rosoff 和 Rosenberg[12] 所认为的酸变性涉及一个质子加到鳥嘌呤的氨基上，然后使包括鳥嘌呤的—NH—CO—在內的邻近氫鍵破坏一定是不正确的，因为碱和酸的逆向滴定曲綫的重合指出酸变性和碱变性的过程是相同的。Cavalieri 和 Rosenberg[34] 的观察，即鳥嘌呤氨基参与氫鍵的形成，象 Pauling 和 Corey (参看第九章)所提出的，亦足以否定这个变性机制。变性过程的可逆性与氫鍵破坏后趋向于裂开双螺旋結构的力有关，这个力一般为热运动力。如果基团保持两面位置正对，則虽然原来連接它們的氫鍵破坏，变性的过程仍是可逆的。在 0°C 时，酸滴定至 pH 3 是可逆的[33]，或許滴定至 pH 2.6 也是可逆的。Geiduschek[39] 曾指出脫氧戊糖核酸分子在这个温度下和在 pH 2.6 时象在中性溶液中一样几乎是完全伸展的。这一观察与 Reichmann、Bunce 和 Doty[21] 的观察

成了一个鮮明的对照，他們观察到在 25°C 下，在这个 pH 时，分子大大地收縮(参看上面)。因此显然，在 0°C 时虽然极可能大部分的氫鍵被破坏，而多核苷酸鏈仍保持两面位置正对。这究竟是由于单純温度的影响，还是正象 Jocobson[40,41] 及其同工者所认为的那样，在大分子如脱氧戊糖核酸盐离子的影响下，在 0°C 时水的規律性結构显著增加的緣故，还不清楚。在这方面，Peacocke 及其同工者[31~33]的观察，即在 +0.4°C 下滴定至 pH 2.6 时有 40% 氫鍵被破坏，而在 −0.75°C 下滴定至这个 pH 时沒有氫鍵被破坏，可能是有意义的，并且这个观察指出，这个影响不可能是单純的热影响。象 Cavalieri 和 Rosenberg[34] 所指出的，在較高温度下发生变性的 pH 会随着温度升高而增大。

热 变 性

滴定研究最先証明，当将脱氧戊糖核酸鈉在中性水溶液中加

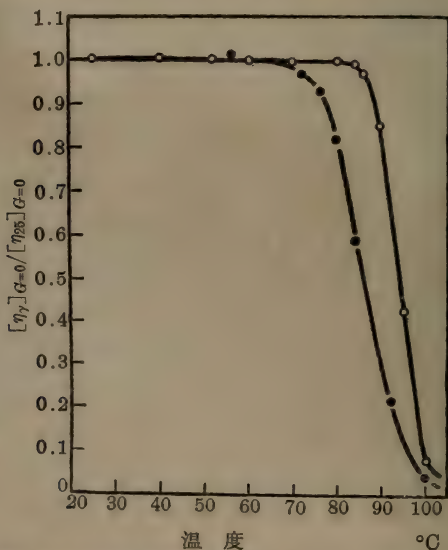


图 71 两个不同脱氧核糖核酸鈉样品在不同温度下加热 1 小时的特性粘数随着温度的改变

(S. A. Rice 和 P. Doty: *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, 3939 頁)

热时有不可逆变性发生[5,6]。Thomas[8] 后来发現，只有在高于某一临界温度时才发生热变性，这一温度是决定于离子强度以及脫氧戊糖核酸鈉的天然状态和来源。这个临界温度(一般在70～85°C 范圍內)的存在已被 Goldstein 和 Stern[42]，Zamenhof、Alexander 和 Leidy[43]，Zamenhof、Griboff 和 Marullo[44]，Rice 和 Doty[45,46]，Hermans 和 Freund[47]，Freund、Pouyet 和 Sadron[48] 以及 Cox 和 Peacocke[49] 的种种实驗技术所充分証实。图 71 表明热变性的一般行为。图中表示出脫氧戊糖核酸溶液在不同温度下加热一小时的特性粘数随着温度的改变[45]，在温度升高到临界温度 70° 至 85°C 范圍內以前，粘度一直保持在室温时所得到

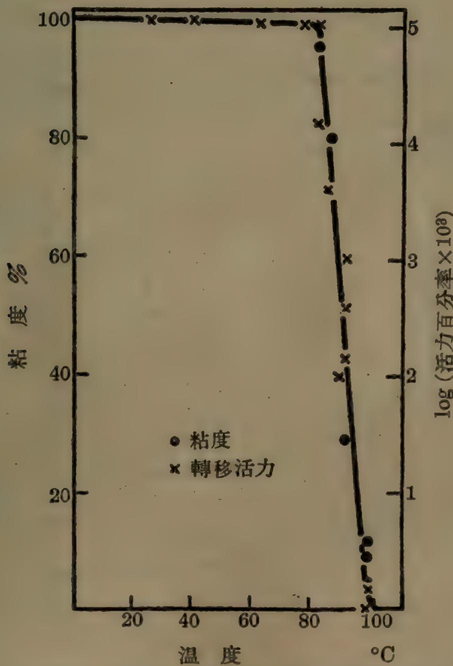


图 72 从 *Haemophilus influenzae* 提取出来的脫氧戊糖核酸的粘度和轉移活力的变化。(所有粘度都在 23°C 时测定，图中粘度数值代表比粘度对开始粘度的百分数)

(S. Zamenhof, H. E. Alexander 和 G. Leidy: *J. exp. Med.* 1953, **98**, 379 頁)

的原来高数值；此时若再升高温度，粘度則急剧下降至很低的数值。Zamenhof、Alexander 和 Leidy[43] 也曾指出特性粘数下降的临界温度与从 *Haemophilus influenzae* 提取出来的具有轉移活力的脫氧戊糖核酸失去轉移活力时的温度相同(图 72)。这种粘度的下降并不伴随着任何分子量的改变[45~47]，虽然經长时期的加热，特别在 100°C 或接近 100°C 时的加热，还是会产生分子降解而使分子量降低。但是，粘度的下降却伴随着均方半徑的显著减小，从天然核酸盐原来的 2800Å 减到在 94°C 时的一个基本稳定的中間数值，然后再降到在 100°C 时的最后的約 1000Å 的数值。这个收縮作用代表均方末端距减小約十五倍[46]，同时伴随着沉降系数分布的稍微增寬，但其平均值并不改变。

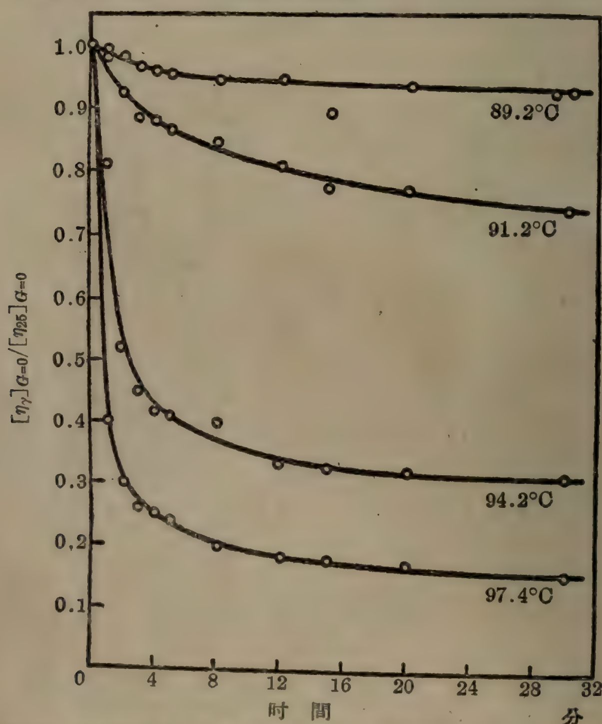


图 73 在不同温度下脫氧核糖核酸鈉的特性粘数变化与时間的关系
(S. A. Rice 和 P. Doty: *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, 3939 頁)

在不同温度下加热1小时的粘度随着温度升高而急剧下降(图71)是一个具有分子內部有規律結构的变性特征、或者融熔特性的构型改变的标志。但是,在临界温度以上的每一个温度,粘度随着时間降低到某一特指的高度，这一高度是那个特殊温度的特征而不是所有温度的共同特征(图73)。因此这似乎变性过程只能进行至一定程度,这一程度决定于温度。在任何給定温度下,变性的程度可由电位滴定方法加以测定。Cox 和 Peacocke[31,32,49]曾指出(图74),在不同温度下加热一小时会产生不同的滴定曲綫，从这些差别可以得到表示氫鍵破坏程度的曲綫。随着温度的变更以及用这个方法計算出的氫鍵破坏比数的改变表示一个相当于从粘度测定观察到的临界温度，而且也可与 Thomas[5] 所观察到的随温度升高而升高的光密度相比拟(图75)。在这两个曲綫中所出現的阶梯使人认为变性过程是經过两个阶段的，或許这两个阶段相

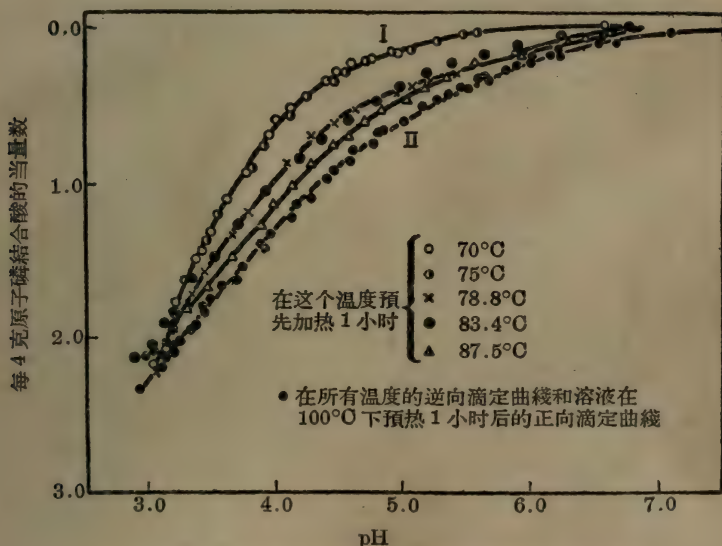


图74 預热处理对鯡魚精子脱氧戊糖核酸鈉滴定曲綫的影响

I和II分别为原来未加热的核酸的正向滴定曲綫和逆向滴定曲綫。表示在正向滴定曲綫上各点为預热1小时的核酸溶液(0.15%，在0.05*M*氯化鈉中)

(摘自 R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. chem. Soc.* 1956, 2648 頁)

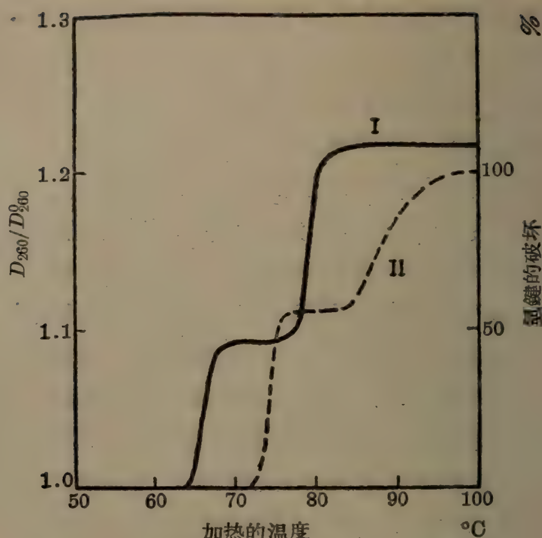


图 75 光密度和氫鍵破坏数随着加热温度的变化

I. 小牛胸腺脫氧核糖核酸光密度的变化; II. 鯡魚精子脫氧戊糖核酸氫鍵破坏的百分数

(R. Thomas: *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, 235 頁; R. A. Cox 和 A. R. Peacocke: *J. chem. Soc.* 1956, 2651 頁)

当于氫鍵的不同的稳定程度。

从所观察到的在每一个温度下变性只能进行到一定的特定限度(图 73),氫鍵强度势必至于不能完全相等。这与脫氧戊糖核酸分子的已知的不均一性有关,并且可以作出推断性的解釋,即在一个給定的温度下,一些分子已全部变性,而另一些分子則完全沒有变性。但是,更可能的是在某一个分子內部氫鍵的强度可能是不均一的,因此在每个特定的温度下,每个分子中氫鍵的某些次序受到破坏。因而总的組成的不均一性容許在有些分子中較在另一些分子中能够进行进一步的变性。在整个变性过程中分子量的恒定表示出在完全变性状态时纏繞的多核苷酸鏈可被一些剩余的或重新形成的氫鍵連結在一起。

Rice 和 Doty[46] 从个别温度下所得到的平衡粘度計算出反应热和反应熵,其数值分别为 110 仟卡/克分子和 300 e.u.。并且从

随着时間变化的粘度下降率亦可得到一級反应速率常数，因此可計算出活化能和活化熵，其数値分别为 145 仟卡/克分子和 325 e.u.。但是，要解釋这些数据是困难的，因为它們是否指一克分子的脱氧戊糖核酸分子，或是指一克分子的‘裂片’，即分子中的超分子的部位(ultra-molecular regions)，还不清楚。

象 Thomas[8] 首先所指出而后来为 Zamenhof、Griboff 和 Marullo[44] 以及 Litt[50] 所証实的，发生变性的临界温度与离子强度有关。降低离子强度能产生在較低温度的临界值。这与已經被 Coates[24] 所証实的 Miyaji 和 Price[51] 以及 Sadron[52] 的观察相符合，即电解质的存在对脱氧戊糖核酸受热变性具有保护作用。这些观察証明了除去电解质时和加热时所发生的变性过程間的关系。临界电解质濃度随着温度的升高而显著地增高。在任何温度

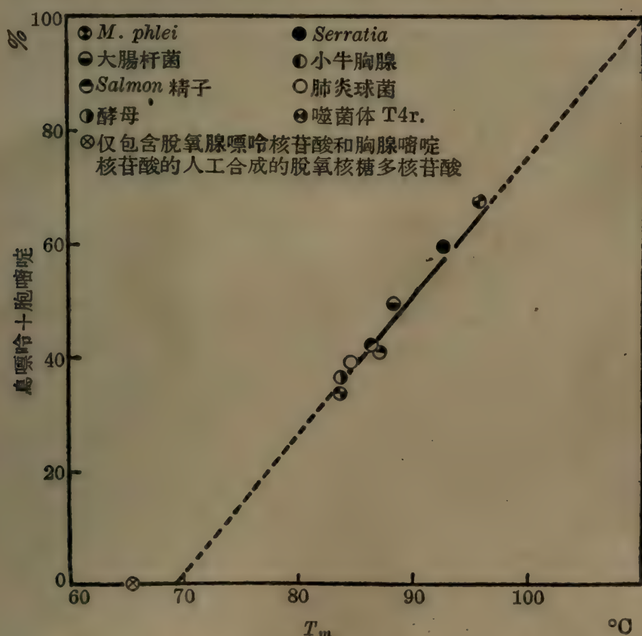


图 76 变性温度(T_m)对各种不同脱氧核糖核酸样品的鳥嘌呤-胞嘧啶含量的依賴关系

(J. Marmur 和 P. Doty: *Nature, Lond*. 1959, **183**, 1428 頁)

下低于这个临界濃度时都会发生变性。

象 Thomas[8] 原先所观察到的，发生变性的温度是随着脱氧戊糖核酸的来源而改变的。这也可能与核酸的不均一性有关，因为 Doty、Boedtker、Fresco、Haselkorn 和 Litt[53] 曾观察到一些迹象，即这个变化包含着个别核酸分子的一系列交迭变化。这种随不同分子而产生的变性温度的变化只能在碱基对間所形成的氫鍵具有不同强度时才能发生。最近 Marmur 和 Doty[54] 曾将脱氧戊糖核酸的組成与变性温度联系起来对这个現象加以証实。图 76 表示变性温度是各种不同核酸的鳥嘌呤-胞嘧啶含量的函数。当将鳥嘌呤-胞嘧啶含量外推至零时，变性温度为 69°C，这与合成的腺嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核糖核酸的变性温度非常符合。

变性剂对脱氧戊糖核酸的作用

使蛋白质变性很有效的物质如尿素、盐酸胍和水楊酸鈉等可以想象也能促进脱氧戊糖核酸的变性。Rice 和 Doty[46] 研究了 $8M$ 尿素、$3.2M$ 盐酸胍和 $0.8M$ 水楊酸鈉的作用，他們指出发生热变性的临界温度因这些試剂的存在而降低(图 77a)。尿素使脱氧戊糖核酸产生变性的作用已进行过相当广泛的研究，虽然不同的研究者所得到的結果有些不一致。在室温下，Rice 和 Doty[46] 发現在 $0.15M$ 氯化鈉溶液中时尿素对特性粘数沒有影响，虽然 Conway[55] 观察到了特性粘数的升高。Conway 和 Butler[56] 观察到当加入尿素时，脱氧戊糖核酸的相对粘度則降低，这种降低的粘度不能用透析法除去尿素而使其回升。但是，这些实驗是在覺察到不应将电解质濃度降低至某一极限値的重要性以前进行的。Mathieson 和 Porter[57] 曾发現把尿素加到脱氧戊糖核酸的 $0.2M$ 氯化鈉溶液中时会使分子的柔性增加，这可以从流动双折射的测定加以确定。这种現象与分子內有若干氫鍵破裂相符合。

Alexander 和 Stacey[26,58~60] 根据脱氧戊糖核酸在 $8M$ 尿素溶液中的光散射研究断言在这些条件下脱氧戊糖核酸完全变性，并且双螺旋解离为两条多核苷酸鏈，每一条鏈的分子量为原来分

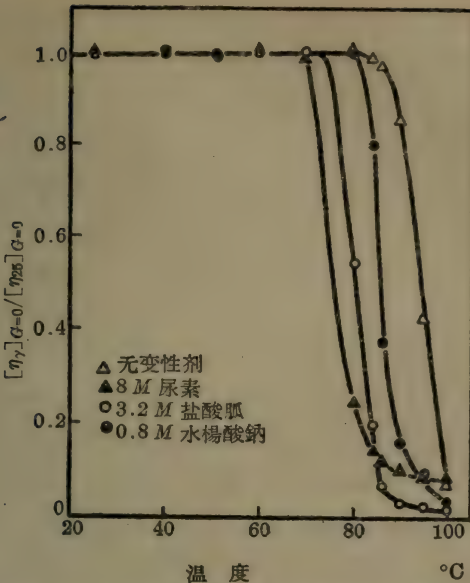


图 77a 有氫鍵破坏剂存在时将脱氧核糖核酸鈉加热 1 小时的特性粘数随着温度的变化

(S. A. Rice 和 P. Doty: *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, 3939 頁)

子的分子量的一半。这些結果曾受到 Rice 和 Doty[45] 的批評，他們认为应用 Alexander 和 Stacey 所用的条件不可能进行光散射測定。而且，虽然可以从滴定研究証明脱氧戊糖核酸完全变性，但是还没有其他的变性方法可以导致分子量的改变，因此这些观察似乎并不正确。

因此我們可以断定能够用破坏氫鍵結构而使某些蛋白质变性的变性剂，虽然能够帮助其他方法使脱氧戊糖核酸变性，但它們本身并不能使脱氧戊糖核酸产生任何显著的变性。

关于脱氧戊糖核酸变性的結論

上述的变性研究完全証实了 Watson 和 Crick 所設計的以氫鍵結合的結构。这些研究的生物学意义在于变性与脱氧戊糖核酸可能的复制机制間的关系。如果脱氧戊糖核酸的复制是按照一条

多核苷酸鏈作为脫氧戊糖核酸合成的模板的机制进行，就可以明白特殊的氫鍵在这样的复制过程中所起的重要作用。按照相反的过程——变性，我們可以得到有关保持两条多核苷酸鏈两面位置正对所需的力的本性的知識。

变性的研究亦曾导致有关脫氧戊糖核酸双螺旋結构的重要結論。根据热降解和酶降解的研究，Dekker 和 Schachman[61] 认为这两条多核苷酸鏈是不連續的；但是，在任何能使脫氧戊糖核酸变性的方法中不发生分子量的改变似乎使这个結論不能成立，因为如果多核苷酸鏈眞的是不連續的話，几乎就可肯定在所有氫鍵断裂时，一些較短的多核苷酸将从分子母体分出。

因此我們可以断定：能够产生变性的各种不同方法都能够因氫鍵的破坏而产生一个較天然核酸分子更为柔軟的崩解的分子，

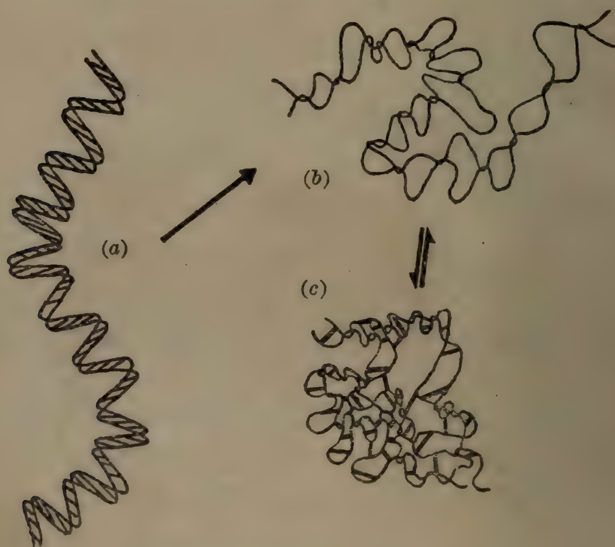


图 77*b* 脫氧戊糖核酸变性的图解

(*a*) 代表未变性的双螺旋，这个双螺旋在变性时生成两条纏繞的，沒有氫鍵結合的多核苷酸鏈(*b*)除去变性条件后能使其重新形成某些非特殊的氫鍵。从(*a*)变至(*b*)是不可逆的，而从(*b*)变至(*c*)則是可逆的

(R. B. Inman 和 D. O. Jordan: *Biochim. biophys. Acta*, 在印刷中)

而在这个分子中的两条多核苷酸鏈仍旧纏繞着。因这个結果所产生的嘌呤碱和嘧啶碱排列次序的丧失使紫外吸收增高，而且也是随着变性过程所产生的熵的大大改变的原因。两条多核苷酸鏈的相互扩散分开或許可受某些剩余的氫鍵或重新形成的氫鍵所阻止，或者也可由在低温下与水結构形成的交替氫鍵来阻止(图 77*b*)。

脫氧戊糖核酸的降解

与产生变性的一些变性剂长时間作用会使脫氧戊糖核酸分子降解。因此用强酸或强碱处理和在 100°C 下长时間加热都会使核酸先行变性，接着会因磷酸酯鍵的破坏或嘌呤碱的脫落而降解。超声波和电离輻射都会产生降解，这种降解的发生在某些条件下不会預先使氫鍵結合的結构受到破坏。解聚酶也能使脫氧戊糖核酸分子降解。

象上面已經指出的，在 pH 2.6 左右时，酸对脫氧戊糖核酸的作用是使分子变性，但不使分子量改变。在酸性更强的条件下，嘌呤碱(腺嘌呤和鳥嘌呤)釋出，核苷酸間的鍵断裂。Tamm、Hodes 和 Chargaff[62] 曾指出，在 pH 1.6 和 37°C 时，約經 24 小时后所有的嘌呤碱将全部除去。在此时間內多核苷酸鏈已断裂成为小碎片。这样降解的产物称为无嘌呤酸。再經徹底水解，将产生嘧啶碱、糖和磷酸(参看第四章，64 頁)。因此酸降解可分为两个同时发生的机制，卽磷酸酯鍵和苷鍵的破裂。Thomas 和 Doty[22] 根据脫氧戊糖核酸在 pH 2.6 时的温和酸水解的动力学研究提出，在崩解的核酸分子中可能存在涉及殘余氫鍵破坏的第三种类型的降解。这些降解过程的速率有显著的不同[63]。每小时每一个脫氧戊糖核酸分子（重量平均值）有約 24 个腺嘌呤分子和相同数目的鳥嘌呤分子釋出。磷酸酯鍵的断裂非常緩慢，每小时每一个脫氧戊糖核酸分子約断裂 0.1 个鍵。Thomas 和 Doty[22] 估計了殘余的氫鍵，其数目为每一个分子中約有 7 个。这些殘余的氫鍵似乎对

酸有令人惊奇的强烈抵抗能力，因为按照 Thomas 和 Doty 的工作的結果，殘余氫鍵衰变的速度只能在50小时以上才能完全消失(在25°C 和 pH 2.6 的情况下)。这些殘余氫鍵存在的証据是相当偶然的，并且是根据这样的迹象的，即約近 50 小时时，脫氧戊糖核酸的降解似乎就是双螺旋的降解，而在这个时間以后，多核苷酸鏈分开，单鏈发生降解。Thomas 和 Doty[22] 的研究結果进一步支持了排除 Dekker 和 Schachman[61] 所建議的天然脫氧戊糖核酸的不連續綫鏈模型，因为如果多核苷酸鏈中的这些折断已經存在于天然的脫氧戊糖核酸中，那么就可以預期到分子量的降低将比实际所观察到的快得多。

脫氧戊糖核酸鈉溶液在100°C时加热超过变性所需的时間将导致核酸盐的进一步降解[46]。从光散射測定发現在約 30 分钟内分子量保持不变，在这个时間內变性反应进行到平衡状态。此后約在 2 小时內分子量迅速下降至接近原来分子量的三分之一。在这个反应中断裂的鍵的性质还不能断定，但是很可能其中有磷酸酯鍵。

与所有降解的过程一样，超声波对脫氧戊糖核酸作用的性质与它的能量和作用的时間有关。但是，有关超声波对所作用的鍵的类型的研究尚未得到完全一致的結果。Laland、Overend 和 Stacey[6] 观察到超声波作用对在 259 mμ 处的光密度的影响不大，这一結果后来为 Laland、Lee、Overend 和 Peacocke[64] 所証实。但是，这些研究是用已經稍微变性的脫氧戊糖核酸样品进行的，这种变性可能是由于溶解于水的緣故，因为与所接受的天然脫氧戊糖核酸的 $\epsilon(P)$ 值約 6600 相比时其原来的 $\epsilon(P)$ 值是 7500[64]。因此超声波对天然的氫鍵結合結构的作用还不能加以确定。从 Lee 和 Peacocke[65] 的电位滴定研究，因为超声波作用后的核酸的正向滴定曲綫与逆向滴定曲綫的差别小于天然核酸的这两个滴定曲綫的差别，因此显然在超声波作用中发生了一些氫鍵結合結构的破坏。但是，变性决不完全，而且一些核苷酸間的鍵也被断裂。在另一方面，Doty、McGill 和 Rice[66] 反而认为超声波并不扰乱天然核酸

的氫鍵結合結构，仅使双鏈切断而产生脱氧戊糖核酸的同系物。超声波作用前后的 $\epsilon(P)$ 值的一致和发生热变性时的温度不变是沒有发生任何变性的証据。并且超声波断片的电子显微鏡研究[67]亦証实沒有变性，而只显出一些单鏈偶然断裂的迹象。这些結果的不一致可与超声波作用的方法不同联系起来，因为 Doty、McGill 和 Rice 已經注意到不将脱氧戊糖核酸盐溶解在水中，而只将其溶解在盐溶液中，并且还将超声波作用在沒有氧的存在下进行。在早期的实驗中[42,63~65]并沒有遵守这些注意点。

人們已經了解到电离輻射，即 X-射綫和 γ-射綫对脱氧戊糖核酸溶液的影响是产生显著的降解，一般的标志是粘度的降低、流动双折射的消失和分子量的减小[68~75]。这个降解也曾經确定是由于在氧的存在下，射綫使水分子破坏所形成的 $OH\cdot$ 和 $HO_2^{\cdot}$ 基团的間接作用[69,76~80]。但是，根据粘度的消失，只要粘度的測定是在照射后有充分的长时間使‘后作用’完成后进行的[73,76,77]，則不論其是在有氧或无氧的条件下进行照射[81]，一个給定剂量的 X-射綫对脱氧戊糖核酸所产生的最后的总的破坏总是一样的。Cox、Overend、Peacocke 和 Wilson[82,83] 与 Butler、Pain、Robins 和 Rotblat[84] 都曾研究过剂量对特性粘数的影响。前几个研究者指出 $\log[\eta]$ 是 $\log R$ (R 为高剂量时)的直綫函数，其中 R 为 γ-射綫的剂量，而后几个研究者則观察到 $[\eta]$ 与 140 KV X-射綫剂量和 15 MeV 电子剂量間有直綫关系。根据 Cox、Overend、Peacocke 和 Wilson[82,83] 的研究，γ-射綫照射会产生在两条多核苷酸鏈中接近相对位置处的双螺旋的双鏈切断和某些特殊氫鍵的破坏。根据电位滴定和在 259 mμ 处光密度的增加所測得的資料，氫鍵的破坏是逐漸的，随着剂量的增大而增加。

这些結論曾被 Peacocke 和 Preston[83] 所証实，他們測定了由 γ-輻射所产生的脱氧戊糖核酸降解产物的分子量。根据大分子降解的理論[85,86]，$\log[\eta]$ 对 $\log R$ 作图所成直綫的斜率应該等于在 $[\eta]=KM^{\alpha}$ 公式中的 $-\alpha$。公式中的 K 为一常数，M 为分子量。从降解研究中发現斜率为 -1.85[82,83]，而从对降解溶液所作

分子量測定的研究中，則发現 α 值为 1.0，略大于 1.85 的一半。这种現象 Peacocke 和 Preston[33] 解釋为是双鏈断裂的証据而不是单鏈断裂的証据，因此証实了 γ-射綫降解是涉及在脫氧戊糖核酸分子中有两个独立的并在对向位置上断裂的机制。在断裂共价鍵前并不断裂所有氫鍵的 γ-射綫照射是从 γ-射綫照射后的核酸盐經热变性所发生的分子量降低的观察証实的[33]。显然，已降解的核酸盐的短的多核苷酸鏈要在氫鍵破坏以后才能扩散分开。因此可以断定电离輻射作用一般是先使脫氧戊糖核酸的部分变性和降解同时发生。更长时間的照射或深度照射会产生更彻底的分解，諸如嘌呤碱和嘧啶碱的脫氨，糖的氧化和脫羥等。

結晶的胰脫氧核糖核酸酶[87]长期与脫氧核糖核酸作用后产生 5′-核苷酸、寡核苷酸和不能透析的碎片。脫氧核糖核酸酶在核苷酸制备中的应用已在第四章中討論过。这里所考虑的是与天然核酸結构有关的酶降解情况。

早先所知道的脫氧核糖核酸酶对脫氧核糖核酸作用的主要特征是：磷酸酯鍵断裂后的二級磷酸基团的釋出[88,89]、粘度和分子量的下降[90,91]以及核苷酸和一个对酶有抵抗作用的‘核’(core)的形成[92,93]。在詳細研究了酶作用过程中分子量和粘度的变化后，現在对酶与核酸間的早期作用已有了更全面的了解。在脫氧核糖核酸酶对核酸的相对濃度相当高时 (0.12～0.8 μg 脫氧核糖核酸酶对 27～28 mg 核酸)，Dekker 和 Schachman[61] 发現当粘度稳定地随时間下降时，光密度則显示出有一个誘导期，并且在粘度下降到約起始数值的 7% 的一段时間內光密度并不改变。他們解釋这种現象为表示双螺旋的破坏是在不影响氫鍵結合的結构下通过磷酸酯鍵的断裂而发生的。

在脫氧核糖核酸酶对核酸的相对濃度較低时 (6×10^{-5} μg 脫氧核糖核酸酶对 650 μg 核酸)，Zamenhof、Griboff 和 Marullo[44] 亦观察到粘度随酶作用时間的下降亦有一个誘导期。Reichmann[94] 用光散射測定分子量随时間的变化时指出粘度的降低是由于分子量的减小，而不是由于变性，因此証实了 Dekker 和 Schachman

的結論。象在测定粘度和光密度时所观察到的，这里亦观察到一个誘导期，在这个誘导期内分子量很少改变。

在脱氧核糖核酸酶的作用过程中，由于通过磷酸酯鍵的破坏而释出二級磷酸基团，因此溶液的 pH 随着降解的进行而改变。这样就使动力学的研究发生困难，因为溶液 pH 的改变将改变脱氧核糖核酸分子的形状，从而产生粘度和光散射性质的改变，这些性质的改变不是由酶降解所直接引起的。这个困难已被 Thomas[95] 所克服，他設計了在酶作用过程中用碱自动滴定溶液以保持 pH 恒定的方法。用这个方法不仅使反应混合物的 pH 保持不变，而且能够从任何給定时間內所加入的碱量計算出磷酸酯鍵破裂的数目。图 78 表示出重均分子量的下降分数〔$M(p)/M$〕为每个母体(z-均)分子的断鍵均数的函数(图 78 中的点代表实驗值。量 $2pu_3$ 的定义为：

$$2pu_3=\frac{\text{需要的 NaOH 克分子数}}{\text{存在的核酸盐的克分子数}}\times\frac{1}{0.91}$$

因数 1/0.91 的由来是假定二級磷酸基团的 pK'_a 值为 6.0，因此保持 pH 7 不变时这些基团只有 91% 被滴定)。粘度衰变的曲綫与此十分相似。在誘导期后随即开始分子量的迅速下降，当达到其原

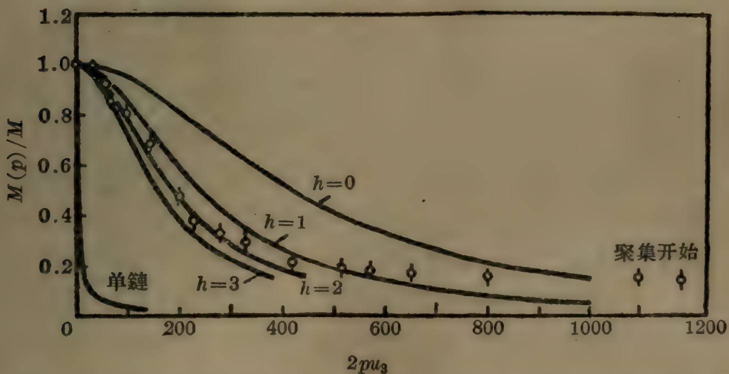


图 78 在酶作用过程中分子量的下降与每个 z-均母体分子断鍵数目的关系
图中的点是从光散射测定的；綫是按双鏈結构降解理論計算的
(C. A. Thomas: *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, 1864 頁)

来的分子量一半时，每分子已有 200 个鍵断裂。在每分子有 1200 个鍵断裂后，Thomas[45] 終于观察到了碎片的迅速聚集。这种聚集可能是由于在中和脫氧核糖核酸鈉溶液到 pH 2.6 的过程中所出現的氫鍵的重新形成所致，而且也可能是表示前面的研究工作者所发現的不受脫氧核糖核酸酶作用的核。这个核不受酶降解，因为它沒有天然的結构。

如果脫氧核糖核酸分子先被脫氧核糖核酸酶降解为仍保留有特殊氫鍵結合的結构碎片，象在光密度升高时有一个显著的誘导期所指出的，則在脫氧核糖核酸的两条鏈中几乎处于对向位置的磷酸酯鍵必然因酶的作用而破裂(不一定同时破裂)。如果氫鍵的結合极强，則为了使分子切断，酶必須使直接对向于一个已断裂的鍵的磷酸酯鍵断裂。这样使两条鏈破裂以产生两个碎片的或然率为：

$$s=p^2$$

式中 s 为双鏈断裂的或然率而 p 为磷酸酯鍵断裂的或然率。如果氫鍵的强度較弱，則 1、2…h 个連接的氫鍵不能使两个碎片結合在一起。在这种情况下双鏈断裂的或然率較大，应为：

$$s=p[1-(1-p)^{2h+1}]\approx p^2(2h+1)$$

图 78 表示出在不同 h 值时所計算出来的分子量衰变。与实驗值最符合的曲綫为 $h=2$ 的曲綫。因此实驗結果似乎可以用脫氧核糖核酸酶随意断裂磷酸酯鍵的假定来解釋，而如果这些断裂是出現在对向的两条鏈中不超过两个氫鍵的距离处，則分子切断。如果断裂距离是在 3、4、5 或更多的氫鍵处，則分子将被氫鍵的相互合作效应(co-operative effect)結合在一起。

分子量衰变的一般本质也指出可能存在的核苷酸对間的所有的鍵都一样地容易受酶的作用而断裂。如果不是这样，而酶仅能断裂某些核苷酸間的鍵，則在分子中对向位置的切断的或然率或近乎对向位置的切断的或然率更非常的小。并且末端选擇性双鏈切断亦将不可能，因为在这样的情况下，在分子量降为原来数值的 90% 以前，每一个母体 z-均分子約有 3000 个鍵被断裂，以代替

所观察到的約 100 个断裂的鍵(图 78)。

将統計理論应用到粘度和沉降常数的数据上，Schumaker、Richards 和 Schachman[96] 曾得到如上所述的脫氧核糖核酸酶作用的动力学的相互补充結果。这个統計理論引出下面的关系式：

$$\log(1-R)=n\log t+\text{常数}$$

式中 R 为在任何时間 t 时所观察到的特性粘数与起始值之比，n 为脫氧核糖核酸分子中的絞鏈数。从粘度测定的結果的分析得出的 n 值为 1.47。所有能够解釋这个数值小于 2 的种种可能性都已經进行过檢查。这些可能性包括制品中单股分子的存在、双股鏈同时受到酶的攻击以及根据 Dekker 和 Schachman[61] 的不連續鏈模型分子中已有的断裂的存在。但是，如果分子中有裂口存在，則所得的結果表示約每 3000 个核苷酸处出現一个裂口，这些裂口的出現次数仍大大少于 Dekker 和 Schachman 原先所設想的。因为这个緣故，Schumaker、Richards 和 Schachman 最后断定他們的結果很好地适合于連續的双股模型，并且要与 Thomas 的观察相一致(参看上面)，也断定当双股鏈都断裂时，阻止一个分子破裂所需要的氫鍵的数目不会多于 6 个。

当酶降解进行时，具有轉移活力的脫氧核糖核酸显示出轉移活力的迅速下降，因此这明显地指出分子量与生物活性間的关系[44]。这种关系曾由 Litt、Marmur、Ephrussi-Taylor 和 Doty[91] 用对超声波碎片进行轉移活力的測定加以研究。他們发現一个約为 1×10^6 的临界分子量，低于这个数值时轉移活力卽消失。这个临界分子量可认为是指与細胞遺傳物质結合的或滲入到細胞中的遺傳物质的最低分子量。

(陶鴻根　譯)

参考文献

[1] Thomas, R. *Experientia* 1951, **7**, p. 261

[2] Thomas, R. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1953, **35**, p. 609

[3] Thomas, R. *Trans. Faraday Soc.* 1954, **50**, p. 304
[4] Gulland, J. M., Jordan, D. O. and Taylor, H. F. W. *J. chem. Soc.* 1947, p. 1131
[5] Cosgrove, D. J. and Jordan, D. O. *Trans. Faraday Soc.* 1950, **46**, p. 793
[6] Cosgrove, D. J. *Thesis*, University of London, 1950
[7] Jordan, D. O. *Progr. Biophys.* 1951, **2**, p. 51
[8] Thomas, R. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 231
[9] Inman, R. B. and Jordan, D. O. *Biochim. biophys. Acta*—in the press
[10] Chargaff, E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 322
[11] Inman, R. B. and Jordan, D. O. *Biochim. biophys. Acta*—in the press
[12] Cavalieri, L. F., Rosoff, M. and Rosenberg, B. H. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 5239
[13] Cavalieri, L. F. and Stone, A. L. *J. Amer. chem. Soc.* 1955, **77**, p. 4699
[14] Pouyet, J., Schiebling, G. and Schwander, H. *J. chem. Phys.* 1950, **47**, p. 716
[15] Dhaussy, M. *C. R. Acad. Sci., Paris.* 1954, **239**, p. 114
[16] Cavalieri, L. F., Rosenberg, B. H. and Rosoff, M. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 5235
[17] Lawley, P. D. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **21**, p. 481
[18] Creeth, J. M., Gulland, J. M. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1957, p. 1141
[19] Cecil, R. and Ogston, A. G. *J. chem. Soc.* 1948, p. 1382
[20] Vilbrandt, C. F. and Tennent, H. G. *J. Amer. chem. Soc.* 1943, **63**, p. 1806
[21] Reichmann, M. E., Bunce, B. H. and Doty, P. *J. Polym. Sci.* 1953, **10**, p. 109
[22] Thomas, C. A. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 1854
[23] Schachman, H. K. *J. cell. comp. Physiol.* 1957, **49**, p. 71
[24] Coates, J. H. *Thesis*, University of Adelaide, 1957
[25] Ehrlich, P. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 4251
[26] Alexander, P. and Stacey, K. A. *Biochem. J.* 1955, **60**, p. 194
[27] Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 747
[28] Doty, P. *J. cell. comp. Physiol.* 1957, **49**, p. 27
[29] Thomas, C. A. *Thesis*, University of Harvard, 1955 (quoted by Doty, ref. 28)
[30] Horn, P., Leray, J., Pouyet, J. and Sadron, C. *J. Polym. Sci.* 1952, **9**, p. 531
[31] Cox, R. A. and Peacocke, A. R. *J. Polym. Sci.* 1957, **23**, p. 765

[32] Peacocke, A. R. Special Publication No. 8, The Chemical Society, London, 1957
[33] Peacocke, A. R. and Preston, B. N. *J. Polym. Sci.* 1958, **31**, p. 1
[34] Cavalieri, L. F. and Rosenberg, B. H. *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, p. 5352
[35] Cox, R. A. *Thesis,* University of Birmingham, 1955 (quoted by Cox and Peacocke, ref. 31)
[36] Sturtevant, J. M. and Geiduschek, E. P. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 2911
[37] Jordan, D. O., Mathieson, A. R. and Matty, S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 154
[38] Cavalieri, L. F. and Rosenberg, B. H. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **21**, p. 202
[39] Geiduschek, E. P. *J. Polym. Sci.* 1958, **31**, p. 67
[40] Jacobson, B., Anderson, W. A. and Arnold, J. T. *Nature, Lond.* 1954, **173**, p. 772
[41] Jacobson, B. *J. Amer. chem. Soc.* 1955, **77**, p. 2919
[42] Goldstein, G. and Stern, K. G. *J. Polym. Sci.* 1950, **5**, p. 687
[43] Zamenhof, S., Alexander, H. E. and Leidy, G. *J. exp. Med.* 1953, **98**, p. 373
[44] Zamenhof, S., Griboff, G. and Marullo, N. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **13**, p. 459
[45] Doty, P. and Rice, S. A. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **16**, p. 446
[46] Rice, S. A. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, p. 3937
[47] Hermans, J. and Freund, A. M. *J. Polym. Sci.* 1958, **28**, p. 229
[48] Freund, A. M., Pouyet, J. and Sadron, C. *C.R. Acad. Sci., Paris* 1958, **246**, p. 1306
[49] Cox, R. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1956, p. 2646
[50] Litt, M. (quoted by Rice and Doty, ref. 46)
[51] Miyaji, T. and Price, V. E. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* 1950, **75**, p. 311
[52] Sadron, C. *Proceedings Third International Congress Biochemistry,* Brussels, 1955, p. 125
[53] Doty, P., Boedtker, H., Fresco, J. R., Haselkorn, R. and Litt, M. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1959, **45**, p. 482
[54] Marmur, J. and Doty, P. *Nature, Lond.* 1959, **183**, p. 1427
[55] Conway, B. E. *J. Polym. Sci.* 1956, **20**, p. 299
[56] Conway, B. E. and Butler, J. A. V. *J. chem. Soc.* 1952, p. 3075
[57] Mathieson, A. R. and Porter, M. R. *J. chem. Soc.* 1958, p. 1298
[58] Alexander, P. and Stacey, K. A. *Nature, Lond.* 1955, **176**, p. 162
[59] Alexander, P. and Stacey, K. A. *Experientia* 1957, **13**, p. 307

[60] Stacey, K. A. and Alexander, P. *Trans. Faraday Soc.* 1957, **53**, p. 251
[61] Dekker, C. A. and Schachman, H. K. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1954, **40**, p. 894
[62] Tamm, C., Hodes, M. E. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1952, **195**, p. 49
[63] Laland, S. G., Overend, W. G. and Stacey, M. *J. chem. Soc.* 1952, p. 303
[64] Laland, S. G., Lee, W. A., Overend, W. G. and Peacocke, A. R. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 356
[65] Lee, W. A. and Peacocke, A. R. *J. chem. Soc.* 1951, p. 3374
[66] Doty, P., McGill, B. B. and Rice, S. A. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1958, **44**, p. 432
[67] Hall, C. E. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 1269
[68] Sparrow, A. H. and Rosenfeld, F. M. *Science* 1946, **104**, p. 245
[69] Butler, G. C. *Canad. J. Res.* 1949, **27B**, p. 972
[70] Taylor, B., Greenstein, J. P. and Hollaender, A. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1947, **12**, p. 237
[71] Taylor, B., Greenstein, J. P. and Hollaender, A. *Arch. Biochem.* 1948, **16**, p. 19
[72] Smith, D. B. and Sheffer, H. *Canad. J. Res.* 1950, **28B**, p. 96
[73] Limperos, G. and Mosher, W. A. *Amer. J. Roentgenol.* 1950, **63**, p. 691
[74] Butler, J. A. V. and Conway, B. E. *J. chem. Soc.* 1950, p. 3418
[75] Conway, B. E., Gilbert, L. and Butler, J. A. V. *J. chem. Soc.* 1950, p. 3421
[76] Butler, J. A. V. and Smith, K. A. *J. chem. Soc.* 1950, p. 3411; *Nature, Lond.* 1950, **165**, p. 847
[77] Conway, B. E. and Butler, J. A. V. *J. chem. Soc.* 1952, p. 834
[78] Smith, D. B. and Butler, G. C. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **72**, p. 258
[79] Scholes, G., Weiss, J. and Stein, G. *Nature, Lond.* 1949, **164**, p. 709
[80] Scholes, G. and Weiss, J. *Biochem. J.* 1953, **53**, p. 567
[81] Daniels, M., Scholes, G., Weiss, J. and Wheeler, C. M. *J. chem. Soc.* 1957, p. 226
[82] Cox, R. A., Overend, W. G., Peacocke, A. R. and Wilson, S. *Nature, Lond.* 1955, **176**, p. 919
[83] Cox, R. A., Overend, W. G., Peacocke, A. R. and Wilson, S. *Proc. Roy. Soc. B* 1958, **149**, p. 511
[84] Butler, J. A. V., Pain, R. H., Robins, A. B. and Rotblat, J. *Proc. Roy. Soc. B* 1958, **149**, p. 12
[85] Charlesby, A. *Proc. Roy. Soc. A* 1954, **224**, p. 120
[86] Charlesby, A. *J. Polym. Sci.* 1955, **15**, p. 263
[87] Schmidt, G. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N.

Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 555
[88] Gregoire, J. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1952, **34**, p. 284
[89] Cavalieri, L. F. and Hatch, B. *J. Amer. chem. Soc.* 1953, **75**, p. 1110
[90] Kunitz J. M. *J. gen. Physiol.* 1950, **33**, p. 363
[91] Rowen, J. W. *Biochim. biophys. Acta* 1953, **10**, p. 391
[92] Zamenhof, S. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1950, **187**, p. 1
[93] Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1953, **208**, p. 445
[94] Reichmann, M. E. *J. phys. Chem.* 1956, **60**, p. 831
[95] Thomas, C. A. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 1861
[96] Schumaker, V. N., Richards, E. G. and Schachman, H. K. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 4230
[97] Litt, M., Marmur, J., Ephrussi-Taylor, H. and Doty, P. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1958, **44**, p. 144

第十二章　核酸的結构(五)
戊糖核酸的結构

引　　言

从第八章中所提出的証据，曾經断定戊糖核酸中的主要的鍵（如果不是唯一的鍵的話）是一个相邻核苷酸間在 3′ 和 5′ 位置处相連接的磷酸二酯基团。假如这是戊糖核酸的唯一連接形式，則戊糖核酸应为綫型的多核苷酸。但是，亦有人认为有些戊糖核酸或者甚至全部戊糖核酸都带有支鏈。支鏈的生成有两种可能方式：第一，通过磷酸三酯鍵（I），第二，通过已在 $C'_{(3)}$ 和 $C'_{(5)}$ 处酯化的戊糖殘基的 $C'_{(2)}$ 羥基处酯化（II）。

Allen 和 Eiler[1] 与 Fletcher、Gulland 和 Jordan[2] 的观察，即酵母核糖核酸的电位滴定曲綫表明在 pH 5 到 7.5 的滴定范圍內每 4 个磷原子有将近一个可滴定基团，为含有磷酸三酯的、具有支鏈的結构 I 的証明。Fletcher、Gulland 和 Jordan[2] 认为这个可滴定基团是一个二級磷酸基团，可由多核苷酸中出現（I）型的支鏈时产生，因为在支鏈末端的核苷酸必定具有一个二級和一个一級未酯化的磷酸基团（具有側鏈的結构（I）并不是唯一的与滴定数据相符合的結构，因为 Fletcher、Gulland 和 Jordan[2] 亦提出过一个含有三酯化的磷原子和 $C'_{(3)}$—$C'_{(2)}$ 鍵代替 $C'_{(3)}$—$C'_{(5)}$ 鍵的直鏈結构。但是，这个結构受到与下面結构（I）同样的批評，而且根据第八章所提的証据亦应予以排除。这个証据指出核苷酸間的鍵主要是 $C'_{(3)}$—$C'_{(5)}$）鍵。戊糖核酸电位滴定曲綫的形状曾被几个研究工作者所証实[3~9]，他們一般也都用在戊糖核酸中有二級磷酸和一級磷酸基团存在的假定来解釋他們的結果。同样，用平衡透析法[9,10]測定戊糖核酸与玫瑰紅結合的結果亦曾証明在戊糖核酸中有二个

与染料結合的不同位置，这二个位置被认为就是一級和二級的磷酸基团。

```
                    |
                    O
                    |
            HO—P—O—糖—碱基
                       |
                       O
                       |
        碱基—糖—O—P—O—糖—碱基
               |            |
               O            O
               |            |
HO或其他    }—P—OH    HO—P—O—糖—碱基
核苷酸的糖                         |
                                   O
                                   |
```

(I)

```
        |
        O
        |
HO—P—O—糖—碱基                OH
         |                     |
         O                  O—P—O—糖—碱基
         |                 /        |
      HO—P—O—糖—碱基              O
              |                     |
              O
              |
           HO—P—O—糖—碱基
                    |
                    O
                    |
```

(II)

尽管这个証据对在戊糖核酸中有一級和二級磷酸基团的存在加以支持，但是这些結論仍常被批評为不能代表天然戊糖核酸的眞正性质[11]。象在第四章中已經指出的，从組織中提取戊糖核酸而同时不使其降解是困难的，因此这几乎可以肯定上面所討論的早先的研究都是用降解的制品进行的。涉及多核苷酸間磷酸二酯鍵水解的降解必然会使二級磷酸基团釋出，因此存在于降解产物中的这些基团的数量与提取方法的性质以及继后的任何分級分离方法的性质有关。这个見解被 Crestfield、Smith 和 Allen[12] 的酵母核糖核酸制品的滴定所証实，这个制品是用比較温和的方法制备的(参看第二章，29 頁)。虽然还沒有测定这个样品的分子量，但

它的溶液所具有的特性粘数比先前所記载的任何数值为高。这个酵母核糖核酸样品在 pH 6～8 之間显示出非常小的緩冲容量，因而这些研究工作者断定这个样品含有每 16 个磷原子不到一个的磷酸基团，这个数值比先前的研究工作者对用比較不細心制备的戊糖核酸样品所观察到的数值低得多。

Cox、Jones、Marsh 和 Peacocke[13,14] 从戊糖核酸的滴定結果，进一步証实了上面的見解，这个戊糖核酸是用温和的方法从 *Areobactor aerogenes* 中提取出来的(在 60°C 时用胆酸鈉在 0.14 *M*

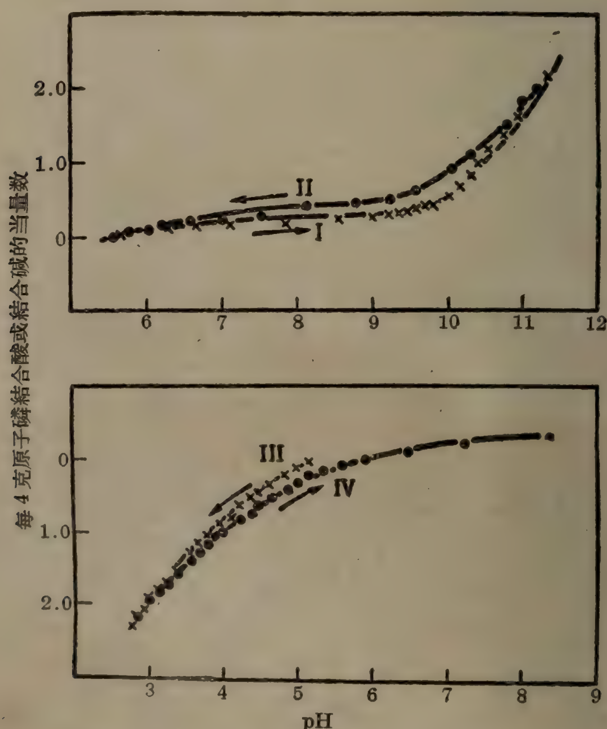


图 79　*Aerobacter areogenes* 核糖核酸鈉的滴定曲綫

I 和 III. 分别为酸滴定和碱滴定的正向滴定曲綫；II 和 IV. 分别为酸滴定和碱滴定的逆向滴定曲綫

(R. A. Cox, A. S. Jones, C. E. Marsh 和 A. R. Peacocke: *Biochim. biophys. Acta* 1956, **21**, 576 頁)

氯化鈉中的1%溶液),并且具有1.5×10^5的分子量(用光散射法測定的)。这个数值比 Fletcher、Gulland 和 Jordan[2] 对酵母核糖核酸研究所得的分子量$1.5\sim2.3\times10^4$(用扩散法測定的[15])要大得多。图79中的滴定曲綫显示出过去只能从脫氧戊糖核酸中观察到的正向滴定曲綫与逆向滴定曲綫的差别。对現在討論更具重要性的是在碱性范圍內的正向和逆向滴定曲綫中在pH 5.0~7.5范圍內的几乎成水平的直綫(图79,曲綫I和II)。这明显地表明在这个核酸中并不存在有可覺察的二級磷酸基团。

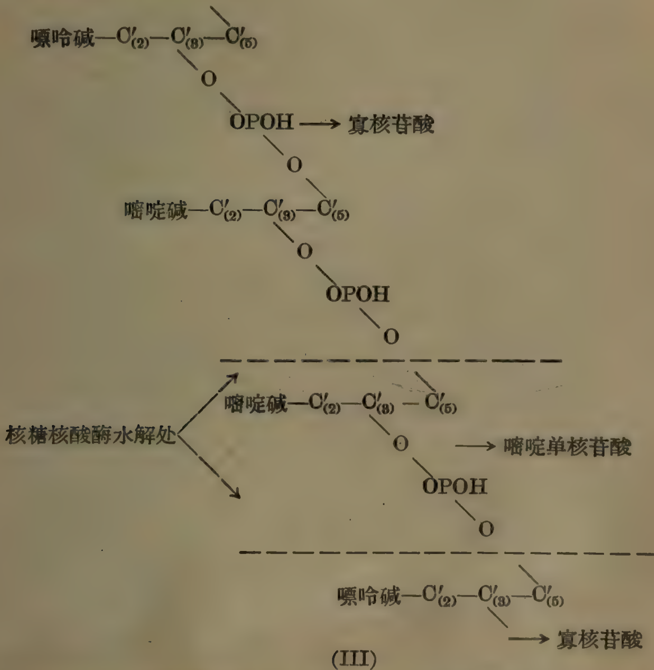
在結构(I)中所假設的支鏈的形成的一个重要特点是有三酯化磷酸基团的存在。如果这个基团与二酯基团同时存在于戊糖核酸中,則核酸的水解将完全依照含有至少两个反应速度常数的复杂途徑进行。Bacher 和 Allen[16] 与 Cavalieri[17] 指出碱水解的途徑是复杂的,而后一研究者发現,为了滿意地解釋反应速度曲綫,必須假定两个反应速度常数,其中一个是高的,另一个是低的。但是,这不能当作支持磷酸三酯基团存在的証据,因为不同核苷酸对之間的二酯鍵的水解速率并不相同,而且水解的第二阶段可能涉及使核苷酸变为核苷和磷酸的水解[16]。更重要的是 Brown、Magrath 和 Todd[18] 的观察,即这个三酯——尿嘧啶核苷-3′-二甲磷酸酯——在任何pH溶液中都是不稳定的,其最大稳定度是在pH 2~3之間;在这个pH范圍內,其半衰期为4~5小时。在pH 0和9时半衰期約为15分钟,而在pH 7时則大約为75分钟。Brown、Magraph 和 Todd[18] 断定在戊糖核酸中不能有磷酸三酯鍵存在,因为他們看到戊糖核酸在pH 7时是稳定的,甚至在pH 10.6时仍显示出沒有很快的降解[19]。

由于上述的証据,尤其是在小心制备的戊糖核酸样品中不含有二級磷酸基团,以及磷酸三酯在水溶液中是不稳定的証据,必須断定沒有滿意的实驗数据可以支持結构(I),因此可以假定在提取出来的戊糖核酸中并沒有磷酸三酯鍵。到底在活細胞的天然核酸中是否有这种磷酸三酯鍵存在仍是一个疑問,因为它在pH 7时并不稳定,除非它是显著地受到核酸与蛋白质結合的影响。

Brown 和 Todd[20] 提出了第二种形成支鏈的可能方式(結构 II)以适应容易被水解的必需条件,例如形成 2′—3′ 环状磷酸三酯(参看第八章, 146 頁),同时还解釋了核糖核酸酶对从戊糖核酸中优先釋出嘧啶核苷酸而留下一个含有原来核酸中的大部分嘌呤核苷酸的不能透析的'极限多核苷酸'(limit polynucleotide)或'核'(core)的作用[9,21~28]。因此Brown 和 Todd[20] 发展了 Magasanik 和 Chargaff[28] 的見解,卽嘧啶核苷酸主要是位在象結构(II)中的側鏈上;而多核苷酸'主干'(backbone)則主要由嘌呤核苷酸所組成。但是,根据 Markham 和 Smith[29] 与 Volkin 和 Cohn[30] 的观察,卽經核糖核酸酶作用后留下的'极限多核苷酸'或'核'对水进行透析时虽然不能透过賽璐玢,但对盐溶液进行透析时則很容易透过,因此对这种戊糖核酸結构的見解必須大大加以修改。这些透过部分的分子量比原来估計的要小很多,其长度只有 3 到 5 个核苷酸。这些观察,与目前所知道的核糖核酸酶的基本作用机制(参看下面)一起考虑时,在很大程度上消除了支持結构(II)的証据。

象 Schmidt 及其同工者[27] 与 Loring、Carpenter 和 Roll[22] 所首先指出的,胰核糖核酸酶只专門断裂 3′-嘧啶核苷酸的磷酸基与相邻的一个嘌呤或嘧啶核苷酸 5′-羥基間的鍵。Brown 和 Todd[31] 成功地証实了这个专一性,他們指出核糖核酸酶立卽水解胞嘧啶核苷-3′-磷酸单酯和尿嘧啶核苷-3′-磷酸单酯(甲酯、乙酯或苯甲酯),但不能水解相应的 2′-磷酸,也不能水解腺嘌呤核苷酸异构体的相应的单酯。Brown、Dekker 和 Todd[32] 与 Markham 和 Smith[33] 也証实了这个专一性。他們观察到核糖核酸酶能立卽水解环状的尿嘧啶核苷和胞嘧啶核苷-2′, 3′-磷酸,但不能水解腺嘌呤核苷和鳥嘌呤核苷的类似物。这些見解亦被核糖核酸酶对合成的多核苷酸作用的結果所証实。这个作用将在第十四章加以討論。因此在核糖核酸酶消化产物中含有嘧啶单核苷酸可以用在一个直鏈的多核苷酸鏈中存在有两个或两个以上相邻的嘧啶单核苷酸来解释。核糖核酸酶将专門水解(III)中虛綫切断处的鍵,因此只能釋出一个嘧啶单核苷酸。如果核糖核酸酶作用在两側都有

一个嘧啶核苷酸所連接的嘌呤核苷酸部位处，则将产生二核苷酸；如果是作用在几个嘌呤单核苷酸連續在一起的地方，則得到較大分子的寡核苷酸[29,34]。



(III)

因此解释核糖核酸酶对戊糖核酸的作用显然不一定需要作具有支鏈的 (II) 型結构的假設，虽然这样的結构也能够象直鏈結构一样适当地解释所观察到的核糖核酸酶的作用[29,35]。

为了想証实在戊糖核酸中具有一个支鏈，曾将酵母核糖核酸甲基化，继以彻底水解、分离和分析甲基化的糖的衍生物。含有一个 3′—5′ 磷酸二酯鍵的核糖核酸直鏈結构，水解后将只使 2′-甲基核糖分离，而带有(II)型支鏈的結构则使水解产物中含有核糖。虽然曾在水解产物中檢出核糖[36,37]，但这被认为不一定是提供支鏈存在的可以信服的証据，因为曾經証明过在甲基化时发生磷酸基团的移位[38]；因此将这个方法应用于多核苷酸时，不一定能对多核苷酸的結构提供可靠的証据，因为在实驗的条件下，核苷酸間

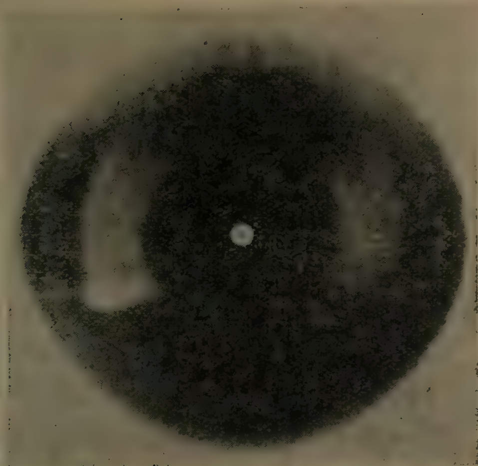
的鏈将随着甲基化而断裂。因此可以肯定目前还沒有直接的証据可以支持或者反对这个带有側鏈的結构(II)。

戊糖核酸的分子构型

与脱氧戊糖核酸有明显的不同，关于戊糖核酸分子构型的知識目前几乎是初步的。成功的 X-射綫衍射研究需要有結晶状态或纤維状态的定向排列的分子。虽然 Rich 和 Watson[39] 曾从濃溶液中用玻璃棒挑出的方法得到戊糖核酸的纤維，象对脱氧戊糖核酸所做的那样(参看第九章，163 頁)，但是分子定向排列的程度还很差，而且不能得到清晰的 X-射綫衍射照片。这可能是因为戊糖核酸分子本来是比較短的，因而更难于作綫型排列，或者因为其形状不規則而不能整齐地密集在一起。

照片 6 表示出 Rich 和 Watson[40] 所得到的一个典型的 X-射綫衍射图譜。亦得到了酵母、小牛肝、小牛胸腺、烟草花叶病毒和蕪菁黃化花叶病毒的戊糖核酸的相同的图片。虽然这提示出一个与来源无关的单独的戊糖核酸結构[41]，但是如果能够得到更清晰的图片，則仍存在有能够观察到不同差别的可能性。要与脱氧戊糖核酸的 X-射綫衍射照片作比較，可将照片 6 与照片 1(164 頁对面) 相比。改变戊糖核酸纤維的含水量会使其 X-射綫衍射图象改变，这使人回想到脱氧戊糖核酸的性质，虽然其图象的改变形式不同。照片 6 是从核糖核酸的干纤維照得的。如果将相对湿度增加到 90% 以上，則粉状环(powder ring)变得清晰，并且出現一个新的环，表示着一个长距离的秩序 (long-range order)。这种“湿”和“干”构型之間的变化是可逆的。

尽管这些 X-射綫衍射图象还不够清晰，但仍可以从它們得到許多推論。在衍射图象中有强烈的衍射点，这些衍射点与沿着纤維軸上的 3.3～4.0 Å 的有規律的間隔相符合。这些衍射点大概同与纤維軸成直角的嘌呤碱和嘧啶碱的堆有关，这一結論被纤維具有負双折射(negative birefringence)的事实所支持。衍射点沿



照片 6 核糖核酸纤维的 X-射綫衍射照象
(A. Rich 和 J. D. Watson: *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1954, **40**, 762 頁)

着纤維軸重复出現的距离为 25～28 Å，这一数值可与結晶状态(A 型)的脱氧戊糖核酸的重复距离 28 Å 和酝晶状态(B 型)的重复距离 34 Å 相比拟。在 12～14 Å 处似乎也有一个强烈的第二次重复距离。在子午綫上在 4 Å 和約 13 Å 之間沒有衍射点；Rich[41] 与 Rich 和 Watson[39,40] 解釋这个現象为表示戊糖核酸的构型是一个螺旋状的結构。在赤道上的衍射点尙未完全判明，因此很难准确测定螺旋的直徑，但曾經估計其大約在 21 Å 和 25 Å 之間[40,41]。

因此戊糖核酸和脱氧戊糖核酸的大小似乎非常接近。但是，从戊糖核酸 X-射綫衍射照片的研究，尙沒有肯定的証据証明到底戊糖核酸是否只含单股多核苷酸螺旋，抑或象脱氧戊糖核酸一样包含以特殊氫鍵連接的双股鏈。从其他研究所得的証据亦不能加以肯定，因此現在不能决定应該选擇这二个之間的哪一个。Cox、Jones、Marsh 和 Peacocke[13] 曾观察到(参看图 79)用温和的方法从 *Aerobacter aerogenes* 提取得到的戊糖核酸的异常滴定曲綫与所观察到的脱氧戊糖核酸的滴定曲綫非常相似(参看图 36，172 頁)。在酸性区域中亦观察到一个用温和的方法从酵母中提取得

到的核糖核酸[14]制品的类似的滴定曲綫。戊糖核酸的正向滴定曲綫和逆向滴定曲綫之間的差距(图79)并不象脫氧戊糖核酸的那么大;虽然如此,这已在实驗誤差限度以外,并且亦不是由于脫氧戊糖核酸所汚染的緣故。从滴定曲綫中可以看出[13]核酸中大約有25～30%的6-氨基和25～30%的—NH—CO—基是以氫鍵連接的。为了要决定氨基和—NH—CO—基是否由氫鍵連接,酸滴定的逆向滴定曲綫与碱滴定的逆向滴定曲綫必須完全重合,正象脫氧戊糖核酸的一样。从Cox、Jones、Marsh和Peacocke[13]的初步研究,这一点还不能确切地加以肯定,虽然所得到的迹象表明这两个逆向滴定曲綫是不重合的。如果这个見解是眞实的話,則意味着与脫氧戊糖核酸中的氫鍵連接相比較时,戊糖核酸中有另一种形式的氫鍵連接。但是,另外一个的解釋只能是:由于参与氫鍵連接的氨基和—NH—CO—基的数量較少,这个戊糖核酸样品是一个由氫鍵連接的和不由氫鍵連接的分子的混和物[42]。

从戊糖核酸的X-射綫衍射图譜与合成的腺嘌呤多核苷酸的X-射綫衍射图譜的比較得到了双螺旋結构的进一步証明(参看第十四章)。虽然腺嘌呤多核苷酸的結构尙不能确切地知道,但从X-射綫衍射图象的研究,Watson[43]认为在每一个单胞(unit cell)內有两条腺嘌呤多核苷酸鏈存在。从各种可能的結构模型以及所預知的关于它們的X-射綫衍射图譜来考虑,还可以进一步认为这两条鏈很可能是和Watson-Crick的脫氧戊糖核酸結构中的两条脫氧多核苷酸鏈一样纏繞在一起。因为腺嘌呤多核苷酸的X-射綫衍射图象和戊糖核酸的X-射綫衍射图象非常相似,因此Watson[43]断定如果腺嘌呤多核苷酸具有以氫鍵連接的双股螺旋結构,則戊糖核酸亦大有可能具有双股螺旋結构。

Watson和Crick的脫氧戊糖核酸模型的主要特点是特殊碱基对間的氫鍵連接,鳥嘌呤与胞嘧啶的氫鍵連接,腺嘌呤与胸腺嘧啶的氫鍵連接。从不同来源提取出来的脫氧戊糖核酸的大量分析数据起初是用来支持这个特殊性的,虽然最近从一些脫氧戊糖核酸級分中所观察到的鳥嘌呤对胞嘧啶和腺嘌呤对胸腺嘧啶的比例

的易变数值（参看表 1, 50 頁）曾使这个証据的有效性发生怀疑。但是，在戊糖核酸中很少发現过互补的比例（参看表 7, 89 頁），虽然 Rich 和 Watson[40,41] 曾指出这样的比例确实存在于从哺乳类动物組織提取出来的某些选擇性的戊糖核酸中。但是，对植物病毒的戊糖核酸来讲，还沒有发現过这种互补的比例。Elson 和 Chargaff[44,45] 认为在戊糖核酸中所以不能找到这样互补的比例，可能是由于只分析了細胞中部分的戊糖核酸的緣故。因此他們发展了从一个細胞中分离出全部戊糖核酸的技术[46~48]。从这些研究的結果（参看表 23）可以看出，虽然腺嘌呤对尿嘧啶和鳥嘌呤对胞嘧啶的比例不等于 1，但它們几乎有相同的数值。这些結論是这样的重要，以致必須认識到在戊糖核酸中不存在有互补的比例可能是因为其他的原因。这可以归因于含有全部核酸样品的不同核酸級分的碱基組成的不同。在每个組分中具有互补的比例。另外，也可以归因于氫鍵連接的无規律性。Watson[43,49] 曾指出，如果戊糖核酸具有与腺嘌呤多核苷酸相同的結构，則氫鍵的連接必定是无規律的。最后，沒有互补的比例能够用单股螺旋或双螺旋形成大量側鏈来解釋。互补的氫鍵連接存在于双股螺旋的主干上而不存在于側鏈上。

对几种能以結晶形式得到的病毒来讲，Franklin 及其同工

表 23 从全組織或全細胞中提取出来的戊糖核酸的克分子比

組織	腺嘌呤	鳥嘌呤	胞嘧啶	尿嘧啶	$\frac{AD}{UR}$	$\frac{GU}{CY}$
牛肝	17.10	27.30	33.90	21.70	0.79	0.80
牛腎	19.70	26.70	33.40	20.20	0.97	0.80
小白鼠腎	19.40	29.50	30.70	20.40	0.95	0.96
海胆	22.56	29.42	27.19	20.82	1.09	1.09
酵母	25.40	24.60	22.63	27.37	0.93	1.09
Serratia marcescens	20.30	31.20	24.30	24.10	0.84	1.28
大腸杆菌	25.30	28.80	24.70	21.20	1.19	1.16
分枝杆菌	20.85	30.75	27.10	21.25	0.98	1.13

（摘自 D. Elson 和 E. Chargaff: *Biochim. biophys. Acta.* 1955, **17**, 369 頁）

者[50~55] 和 Ginoza[56] 曾确定病毒中的戊糖核酸是以直徑为 40 Å 的单螺旋状态存在。这个核酸是埋存在蛋白质亚基里的，因此这个蛋白质亚基对病毒戊糖核酸构型的測定起着重要的作用。如果将蛋白质除去，而使病毒戊糖核酸游离出来，則几乎可以肯定会使戊糖核酸螺旋的大小发生改变，但人們不可能希望单股螺旋的本质也会发生改变。但是，鉴于 Rich 和 Watson[40,41] 所观察到的烟草花叶病毒戊糖核酸和酵母戊糖核酸的 X-射綫衍射图譜的相似，以及酵母戊糖核酸的构型可能是一个双股螺旋，因此不应一概排除烟草花叶病毒的戊糖核酸在提取时从单股螺旋变为双股螺旋的可能性。合成的多核苷酸(参看第十四章)立刻会变成含有相同或不相同的双股或三股螺旋复合体，表示这种聚集并不是不可能的。

由各种化学試剂和酶对戊糖核酸作用[57,58] 所引起的 $\epsilon(P)$ 值的增加，不能认为和天然脱氧戊糖核酸一样是变性的影响，因为天然戊糖核酸的 $\epsilon(P)$ 的最低值是在 7700 和 7800 之間，并且与变性的脱氧戊糖核酸的最低值相符合。这二个数值的相一致并不足为奇，因为这个病毒核酸是用热变性方法从病毒提取出来的。用去污剂法从烟草花叶病毒制备的戊糖核酸，或用重蒸餾的苯酚从烟草花叶病毒提取的戊糖核酸，显示出当加入电解质时，光密度降低約百分之 15 到百分之 22[59]。但是，病毒戊糖核酸并不象脱氧戊糖核酸在原来性质与光密度之間有相同的关系，因为用市售苯酚提取的而在加入电解质时不显示出减色效应 (hypochromic) 的病毒核酸，曾被发現其与显示出光密度变化的制品具有相同的感染能力。

根据上面的討論，当前对戊糖核酸結构的見解显然有些混乱。似乎很有必要对小心提取的制品再进行滴定研究和 X-射綫衍射图譜的研究。在能够进行进一步研究之前，大概也有必要对戊糖核酸的个别級分进行这样的研究。从細胞組織中提取出来的戊糖核酸与从病毒中提取出来的戊糖核酸很可能是根本不同的。目前的証据表明，前一种的戊糖核酸具有一个双股螺旋的結构，而后一种戊糖核酸則为单股螺旋的結构。

溶液中戊糖核酸盐离子的大小和形状

和脱氧戊糖核酸鈉溶液的許多研究工作相比时，有关戊糖核酸鈉溶液的研究工作則很少。幷且从同一来源的戊糖核酸所得的研究結果和从脱氧戊糖核酸所得的研究結果很不相似。存在这个差別的原因是由于从組織中和病毒中提取戊糖核酸时所遇的困难，因为所用的方法通常总是包括一些比用于提取脱氧戊糖核酸时更为不溫和的条件。近年来,因为Fraenkel-Conrat及其同工者与Gierer和Schramm能够从不同的病毒中提取出具有不比原来病毒为少的感染能力的戊糖核酸，因此病毒戊糖核酸的研究变得更有成果。幷且已經肯定这种感染能力是属于全部的或者近乎全部的核酸分子,而不是属于一个特殊的高分子量部分[60,61]。因此可以断定,这样的病毒核酸制品必定能够代表眞正沒有改变的天然核酸。

自从早期为了支持現在放弃已久的四核苷酸的假設而测定分子量以来，戊糖核酸的分子量曾經是爭論的題目。近年来对认为大部分是沒有降解的制品所測得的分子量的結果摘录在表 24 中。表中所列的所有数值都在 10^5 以上,因此无可怀疑,以前所記載的近乎 10^4 和更小的数值[15,68~74]都是从降解样品測得的。1942 年Cohen 和 Stanley[64]指出怎样才能从病毒中用热变性方法提取高分子量的戊糖核酸。此后他們的提取方法曾經改良过。而現在得到公认的核酸的分子量約为 1.7×10^6。因此我們知道至少有一些戊糖核酸具有不小于脱氧戊糖核酸的分子量。如果烟草花叶病毒的戊糖核酸被証明是单股螺旋的話，則在这两个核酸中的单鏈的多核苷酸的分子量一定非常接近。

Hopkins 和 Sinsheimer[67]对制备烟草花叶病毒戊糖核酸方法的审查曾揭露出至少有三种因素影响所得的核酸的分子量。它們是:(1)在热变性过程中病毒的濃度,(2)溶液中磷酸根离子的存在和(3)加热后冷却的速度。当溶液中病毒的濃度大时和冷却快时,則得到的分子量数值大(大于 2×10^6)，这表示有聚集作用,而

表 24 不同戊糖核酸样品的分子量

来 源	分子量×10⁵	測 定 方 法	参考文 献
酵母	1.0~3.0	沉降法,特性粘数法	61
Aerobacter aerogenes	1.5	光散射法	13
鼠肝	2.64	沉降法	62
牛肝	1~3	沉降法,特性粘数法	61
烟草花叶病毒	2.0~2.9	沉降法,扩散法	63
烟草花叶病毒	1.5~1.8	沉降法,特性粘数法	63
烟草花叶病毒	16	沉降法,特性粘数法	64
烟草花叶病毒	10~20	沉降法,特性粘数法	61
烟草花叶病毒	17	光散射法	65,66

在包括采用磷酸緩冲液的大量方法中所得到(指上面的)的分子量为 $1.7\pm0.1\times10^6$。这样得到的戊糖核酸是高度不对称的，在水溶液中的长度約为 1600 Å。

烟草花叶病毒戊糖核酸能自行降解，产生小分子量($0.59\sim0.70\times10^5$)的核酸盐，这种核酸盐具有很小的感染能力或不具感染能力[61]。在自行降解时，分子的破坏似乎是有規律的，而不是随意的[61,64]，这表明沿着分子的鏈在一定的間隔处有弱的核苷酸鍵，或者有結构的不連續。

烟草花叶病毒和鼠肝的戊糖核酸的高分子制品的溶液显示出相当高的粘度[63,64]，这些粘度与速度梯度有关[63]。这似乎核酸离子的长度是随着离子强度的改变而大大地改变。Hopkins 和 Sinsheimer[67] 从光散射法的測定曾指出原来长度为 1600 Å 的戊糖核酸盐离子，当加入电解质时其长度縮短为 1050 Å，而 Kawade 和 Kitamura[62] 根据粘度測定的結果，断定在离子强度低的溶液中核酸盐离子的性质与柔軟的綫型多聚电解质相似。但是，在离子强度高的溶液中，其粘度性质比較接近于相当紧密的自由卷曲分子。因此戊糖核酸盐离子溶液的性质表現出比脫氧戊糖核酸盐离子更为柔軟。这就支持了这样的見解，即戊糖核酸盐离子与其說是具有氫鍵連接的双股鏈結构，毋宁說是具有单鏈的結构。

(潘筱平 譯)

参考文献

[1] Allen, F. W. and Eiler, J. J. *J. biol. Chem.* 1941, **137**, p. 757

[2] Fletcher, W. E., Gulland, J. M. and Jordan, D. O. *J. chem. Soc.* 1944, p. 33

[3] Chantrenne, H. *Bull. Socs. chim. belg.* 1946, **55**, p. 5

[4] Chantrenne, H., Linderstrom-Lang, K. and Vandendriessche, L. *Nature, Lond.* 1947, **159**, p. 877

[5] Vandendriessche, L. *C. R. Lab. Carlsberg* (*Ser. chim.*) 1951, **27**, p. 341

[6] Khouvine, Y. and Grégoire, J. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 1944, **26**, p. 424

[7] Zittle, C. A. *J. biol. Chem.* 1946, **166**, p. 491

[8] Wiener, G., Duggan, E. L. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1950, **185**, p. 163

[9] Cavalieri, L. F., Kerr, S. E. and Angelos, A. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 2567

[10] Cavalieri, L. F., Angelos, A. and Balis, M. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 4902

[11] See for example, Markham, R. and Smith, J. D. *The Proteins* Vol. **2**, part A (Ed. H. Neurath and K. Bailey): Academic Press, New York, 1954, p. 1

[12] Crestfield, A. M., Smith, K. C. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1955, **216**, p. 185

[13] Cox, R. A., Jones, A. S., Marsh, G. E. and Peacocke, A. R. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **21**, p. 576

[14] See also Jones, A. S. and Peacocke, A. R. *Trans. Faraday Soc.* 1957, **53**, p. 254
Peacocke, A. R. Special Publication No. 8, The Chemical Society, London, 1957

[15] Fletcher, W. E., Gulland, J. M., Jordan, D. O. and Dibben, H. E. *J. chem. Soc.* 1944, p. 30

[16] Bacher, J. E. and Allen, F. W. *J. biol. Chem.* 1950, **182**, p. 701

[17] Cavalieri, L. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 4899

[18] Brown, D. M., Magrath, D. I. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1955, p. 4396

[19] Zittle, C. A. *J. Franklin Inst.* 1946, **242**, p. 221

[20] Brown, D. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 52

[21] Schmidt, G., Cubiles, R., Swartz, B. H. and Thannhauser, S. J. *J. biol. Chem.* 1947, **170**, p. 759

[22] Loring, H. S., Carpenter, F. H. and Roll, P. M. *J. biol. Chem.* 1947, **169**, p. 601

[23] Kerr, S. E., Seraidarian, K. and Wargon, M. *J. biol. Chem.* 1949, **181**, p. 773

[24] Carter, C. E. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 2604

[25] Boulanger, P., Montreuil, J. and Masse, L. *C. R. Acad. Sci., Paris* 1951, **232**, p. 1256

[26] Markham, R. and Smith, J. D. *Research, Lond.* 1951, **4**, p. 344

[27] Schmidt, G., Cubiles, R., Zöllner, N., Hecht, L., Strickler, N., Seraidarian, K., Seraidarian, M. and Thannhauser, S. J. *J. biol. Chem.* 1951, **192**, p. 715

[28] Magasanik, B. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1951, **7**, p. 396

[29] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 565

[30] Volkin, E. and Cohn, W. E. *J. biol. Chem.* 1953, **205**, p. 767

[31] Brown, D. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1953, p. 2040

[32] Brown, D. M., Dekker, C. A. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 2715

[33] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 552

[34] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 558

[35] Brown, D. M. and Todd, A. R. *The Nucleic Acids* Vol. **1** (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 409

[36] Anderson, A. S., Barker, G. R. and Farrar, K. R. *Nature, Lond.* 1949, **163**, p. 445

[37] Anderson, A. S., Barker, G. R., Gulland, J. M. and Lock, M. V. *J. chem. Soc.* 1952, p. 369

[38] Brown, D. M., Magrath, D. I. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1954, p. 1442

[39] Rich, A. and Watson, J. D. *Nature, Lond.* 1954, **173**, p. 995

[40] Rich, A. and Watson, J. D. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1954, **40**, p. 759

[41] Rich, A. *Progress in Neurobiology I, Neurochemistry* (Ed. S. R. Korey and J. I. Nurnberger): Hoeber-Harper, New York, 1956, p. 114

[42] Davidson, J. N. and Smellie, R. M. S. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 594

[43] Watson, J. D. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 552

[44] Elson, D. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **17**, p. 367

[45] Elson, D. and Chargaff, E. *Nature, Lond.* 1954, **173**, p. 1037

[46] Elson, D. and Chargaff, E. *Fed. Proc.* 1951, **10**, p. 180
[47] Elson, D., Gustafson, T. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1954, **209**, p. 285
[48] Elson, D., Trent, L. W. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **17**, p. 362
[49] See also Rich, A. *Trans. Faraday Soc.* 1957, **53**, p. 256
[50] Franklin, R. E. *Nature, Lond.* 1956, **177**, p. 928
[51] Franklin, R. E. ane Klug, A. *Acta Cryst.* 1955, **8**, p. 777
[52] Franklin, R. E. *Nature, Lond.* 1955, **175**, p. 379
[53] Klug, A., Finch, J. T. and Franklin, R. E. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **25**, p. 242
[54] Franklin, R. E. and Klug, A. *Trans. Faraday Soc.* 1959, **55**, p. 494
[55] See also Wildman, S. G. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1959, **45**, p. 300
[56] Ginoza, W. *Nature, Lond.* 1958, **181**, p. 958
[57] Holden, M. and Pirie, N. W. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **16**, p. 317
[58] Reddi, K. K. *Biochim. biophys. Acta* 1958, **27**, p. 1
[59] Fraenkel-Conrat, H. *Trans. Faraday Soc.* 1959, **55**, p. 494
[60] Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Williams, R. C. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **25**, p. 87
[61] Cheo, P. C., Friesen, B. S. and Sinsheimer, R. L. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1959, **45**, p. 305
[62] Kawade, Y. and Kitamura, T. *Proc. Seventh Symp. Nucleic Acids,* Nagoya, Japan, 1958, p. 5
[63] Grinnan, E. L. and Mosher, W. A. *J. biol. Chem.* 1951, **191**, p. 719
[64] Cohen, S. S. and Stanley, W. M. *J. biol. Chem.* 1942, **144**, p. 589
[65] Schramm, G. and Gierer, A. Special Publication N. Y. Acad. Sci. 1957, **5**, p. 231
[66] Northrop, G. and Sinsheimer, R. L. *J. chem. Phys.* 1954, **22**, p. 703
[67] Hopkins, G. R. and Sinsheimer, R. L. *Biochim. biophys. Acta* 1955, **17**, p. 476
[68] Loring, H. S. *J. biol. Chem.* 1939, **128**; *Sci. Proc.* **33**, p. 61
[69] Fischer, F. G. Böttger, J. and Lehmann-Echternacht, H. *Hoppe-Seyl. Z.* 1941, **271**, p. 246
[70] Watanabe, I. and Iso, K. *J. chem. Soc. Japan* 1950, **71**, p. 280
[71] Watanabe, I. and Iso, K. *J. Amer. chem. Soc.* 1950, **72**, p. 4836
[72] Delcambe, L. and Desreux, V. *Bull. Socs. chim. belg.* 1950, **59**, p. 521
[73] Jungner, G. and Allgén, L.-G. *Acta chem. scand.* 1950, **4**, p. 1300
[74] See also Jordan, D. O. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 447

第十三章　核酸的結构(六)
多核苷酸鏈中核苷酸的排列次序

引　言

脫氧戊糖核酸和戊糖核酸制品分离成为不同核苷酸組成部分的实現对研究多核苷酸鏈中核苷酸的排列次序具有重要的意义。显然，只有在肯定了所研究的某一核酸部分只含一个单独类型的多核苷酸，其中所有的分子都具有核苷酸数目和排列次序完全相同的情况下，核苷酸的排列次序的測定才能够进行。但是，从第三章中的討論（36頁）可知实驗的方法尙沒有发展到能够进行这样精确的分級分离阶段。在分級分离方法有所进展以前，核苷酸排列次序的研究必然被限制在一定范圍之內。虽然如此，和分析結果所指出的相同，卽从不同組織分离出来的核酸具有很不相同的組成，所以必定具有不同的核苷酸排列次序。因此，实事求是的办法是檢查酶和化学水解所产生的二核苷酸和寡核苷酸的結构。这样做是重要的，因为如果能得到均一的核酸級分的話，用这个方法可能得到核苷酸排列次序上的初步知識。末端磷酸基团的存在和它的性质是另一个有关的問題。

脫氧戊糖核酸中核苷酸的排列次序

脫氧核糖核酸酶对脫氧戊糖核酸的作用是使其生成单核苷酸、核苷和单核苷酸的进一步降解产物以及寡核苷酸。产物的本质决定于消化的条件和消化的时間。长时間的作用，是在所有脫氧戊糖核酸变为单核苷酸之前，使单核苷酸发生降解[1]。經常所用的消化条件是这样的，卽只有少量的单核苷酸发生降解，而使消

化产物中含有的寡核苷酸相当于原来核酸的15%至18%[2]，其中主要为二核苷酸和三核苷酸。

Sinsheimer 和 Koerner[3] 首先分离出二核苷酸。他們从胰脱氧核糖核酸酶作用于小牛胸腺脱氧核糖核酸所得的产物中，用离子交换层析方法分离出两个二核苷酸，一个只含有脱氧胞嘧啶核苷酸([CC])，而另一个則既含有脱氧胞嘧啶核苷酸又含有脱氧腺嘌呤核苷酸([CA])*。Smith 和 Markham[4,5] 証实了并推广了他們的工作，并且成功地用紙层析及电泳方法分离出二核苷酸和三核苷酸。Sinsheimer[6,7] 与 de Garilhe 和 Laskowski[8] 以及 Shapiro 和 Chargaff[9] 从几种不同的脱氧戊糖核酸样品的脱氧核糖核酸酶消化产物中用离子交换层析方法分离出二核苷酸、三核苷酸和二核苷单磷酸，然后将其鉴定。他們成功地用这样的方法来鉴定存在于脱氧戊糖核酸分子中的各种相邻的核苷酸对。二核苷酸或三核苷酸的組分可由紫外吸收光譜的分析[6]、在紙电泳上的移动速率[5]加以测定或更直接地将其定量地降解为单核苷酸，然后将单核苷酸的混合物用色层分析法加以测定[6,10,11]。假若分級分离的操作是滿意的，則所得的单核苷酸克分子比应为整数。从这些方法只能得到二核苷酸或三核苷酸中的核苷酸組分之比，但并不表示这个組分中分子的大小。組分之比可用各种方法测定：(1)用磷酸单酯酶除去末端磷酸基并测定所釋出的磷对总磷的比值[6]；(2)除去末端磷酸基并将剩余物用磷酸二酯酶处理，随即将产物核苷和核苷酸分級分离[6]；(3)除去末端磷酸基，随即分析嘌呤碱、嘧啶碱和磷[5]。从表25中所列 Sinsheimer[6] 的結果，显然一切

* 脱氧核糖多核苷酸結构的表示法——脱氧核糖核苷由开始字母代表：A＝脱氧腺嘌呤核苷；G＝脱氧鳥嘌呤核苷；C＝脱氧胞嘧啶核苷；T＝脱氧胸腺嘧啶核苷；M＝5-甲基脱氧胞嘧啶核苷。在单核苷酸、核苷二磷酸、二核苷酸等中酯化的磷酸位置是用p表示。若酯化位置在某一核苷3′羥基上，則p放在核苷符号的右边，若連在5′羥基上，則p放在左边。若不去区別排列次序的异构体，則包括寡核苷酸的核苷的符号放在方括号內。因此pC为5′-脱氧胞嘧啶核苷酸，Cp为3′-脱氧胞嘧啶核苷酸，pCp为脱氧胞嘧啶核苷-3′,5′-二磷酸；[CT]代表pTpC和pCpT的混合物或代表二核苷酸异构体中的一个

可能的核苷酸对(但不是所有的二核苷酸异构体)是存在于小牛胸腺和麦胚的脫氧戊糖核酸中，而只有 [MM] 是例外。这表明在这些核酸的多核苷酸鏈中的可能存在的十五对相邻的核苷酸对中有十四对出現。在估計这些結果的重要性时必須記住表25中所列的仅代表总消化产物的 1/6。虽然如此，对于几乎所有可能存在的脫氧核苷酸对的鉴定，在核苷酸排列次序的問題上是很重要的。在表25中所列的結果的最显著的特征就是很多量的 5-甲基脫氧胞嘧啶核苷酸伴随着脫氧鳥嘌呤核苷酸而存在。这个特征亦为 Smith 和 Markham[5] 所观察到。胸腺脫氧核糖核酸組分中的[MG]部分說明有 30% 以上的 5-甲基脫氧胞嘧啶核苷酸存在于消化产物中。

除表 25 中所列的二核苷酸外，Smith 和 Markham[5] 曾在鯡魚精子脫氧戊糖核酸的消化产物中檢查出三核苷酸 [ACT] 和

表 25　脫氧戊糖核酸中的二核苷酸

二核苷酸	小牛胸腺脫氧核糖核酸		麦胚脫氧核糖核酸	
	在 260 mμ 处光吸收百分率	P 百分率	在 260 mμ 处光吸收百分率	P 百分率
[MM]	0	0	0	0
[MC]	0.02	0.03	0.11	0.17
[MT]	0	0	0.31	0.43
[MA]	0	0	0.43	0.41
[MG]	0.72	1.03	1.52	2.08
[CC]	0.82	1.11	0.48	0.63
[CT]	2.42	3.12	1.57	1.97
[CA]	3.50	3.32	2.43	2.23
[CG]	0.79	0.87	0.44	0.47
[TT]	1.28	1.38	1.11	1.16
[TA]	1.71	1.46	1.68	1.39
[TG]	2.41	2.77	1.97	2.20
[AA]	0.53	0.46	0.46	0.39
[AG]	1.44	1.17	1.15	0.90
[GG]	0.76	0.82	0.76	0.79
总計	16.40	17.54	14.42	15.22

(R. L. Sinsheimer: *J. biol. Chem.* 1954, **208**, 454 頁)

[AMT]。

用上述方法分离出来的二核苷酸級分中可能包含二核苷酸异构体 pXpY 和 pYpX 的混合物或純粹的异构体。在任何二核苷酸的級分中，二核苷酸异构体的克分子比可用下述方法测定[7]：(1)用离子交换层析法将混合的二核苷酸异构体分离；(2)用前列腺的磷酸单酯酶除去混合的二核苷酸异构体的末端磷酸基；(3)用离子交换层析法将混合的二核苷单磷酸二酯异构体分离；(4)用提純的蛇毒磷酸二酯酶将混合的二核苷单磷酸二酯分离；(5)用离子交换层析法将上述的消化产物中单核苷酸(-5′-磷酸)部分回收并加以鉴定。从每一个核苷酸組分的光密度和已知的核苷酸的消光系数[6] 可以計算出两个核苷酸(X 和 Y)的克分子比(X/Y)。这个克分子比等于二核苷酸异构体 pYpX 和 pXpY 的克分子比(pYpX/pXpY)。这个方法的根据是假定二核苷酸的末端磷酸基連于5′位上而不是3′位上(卽 XpYp 和 YpXp 类型的异构体的形成并不是由于脱氧核糖核酸酶作用的結果)，并且也假定蛇毒磷酸二酯酶总是分裂3′位上的5′-3′磷酸二酯鍵的。这些假定的真实性已被典型的实驗所証明[7]。

分析从小牛胸腺脱氧戊糖核酸(表25)所得到的二核苷酸可以得到表26中所列的二核苷酸异构体的克分子比。显然，对于含有一个嘌呤核苷酸和一个嘧啶核苷酸的那些二核苷酸来讲，除一个例外外，磷酸二酯基連結着一个嘌呤核苷的5′位和一个嘧啶核苷的3′位，并且末端磷酸是在嘧啶核苷5′位上(例如 pCpA)的异构体，其数目大大超过了具有相反次序的异构体。在两例中(pApC 和 pGpM)，后面一个类型的异构体不能被檢出。二核苷酸[CG]是一个例外，其 pGpC 在消化产物中多于 pCpG。观察到的核苷酸排列次序不仅对脱氧戊糖核酸的結构具有一定的意义，并且对脱氧核糖核酸酶的作用机制也有同等的意义。在后者的机制沒有得到更充分的了解之前，不能对这些数据作出完全的解釋。

Shapiro 和 Chargaff[9,12] 曾从另一角度解决了脱氧戊糖核酸中核苷酸排列次序的問題。在脱氧戊糖核酸的酸水解产物中存在

表 26 小牛胸腺脱氧戊糖核酸中的二核苷酸异构体的克分子比

二核苷酸	P 百分率	二核苷酸	P 百分率
pCpM	—	pMpC	—
pTpM	0	pMpT	0
pApM	0	pMpA	0
pGpM	0	pMpG	1.03
pTpC	0.78	pCpT	2.34
pApC	0	pCpA	3.22
pGpC	0.75	pCpG	0.12
pApT	0.10	pTpA	1.36
pGpT	0.16	pTpG	2.61
pGpA	0.97	pApG	0.20

(摘自 R. L. Sinsheimer: *J. biol. Chem.* 1955, **215**, 581 頁)

有脱氧胞嘧啶核苷 3′, 5′-二磷酸和脱氧胸腺嘧啶核苷 3′, 5′-二磷酸使 Levene[13] 断定在核酸中只能有一种相互交替的嘌呤-嘧啶核苷酸排列次序。这个解釋是以嘌呤核苷酸較嘧啶核苷酸对酸較不稳定为根据的[14]。Brown 和 Todd[15] 本来认为由于核苷酸間連接鍵的随意切断的結果，在水解产物中可以預期到有一定分量的这些二磷酸盐存在。但是，Dekker、Michelson 和 Todd[16] 后来认为在这样的情况下产生如此多的分量未免估計得太大了，因此 Brown 和 Todd[17] 断定二磷酸盐的存在可以认为是由于在核酸中含有相当平均分布或随意分布的嘌呤和嘧啶脱氧核糖核苷酸。Shapiro 和 Chargaff[9] 对于从脱氧核糖核酸酶消化脱氧戊糖核酸所得的产物中用离子交換层析法分离出的一系列二核苷酸的酸水解速率进行了詳細的观察。这些二核苷酸都有脱氧胞嘧啶核苷酸作为一个組分，例如 [AC]、[CC] 和 [TC]。鉴于[GC]的性质被认为与 [AC] 的性质十分相似，因为在形成无嘌呤酸时釋出腺嘌呤和鳥嘌呤的速率与从脱氧戊糖核酸中釋出腺嘌呤和鳥嘌呤的速率相同，对 [GC] 幷沒有进行过研究。在这三个二核苷酸中，[AC] 对酸最不稳定。这个二核苷酸是一个 pCpA 和 pApC 的次序异构体的混合物。只有前一个异构体才能水解生成 pCp，而且看来是

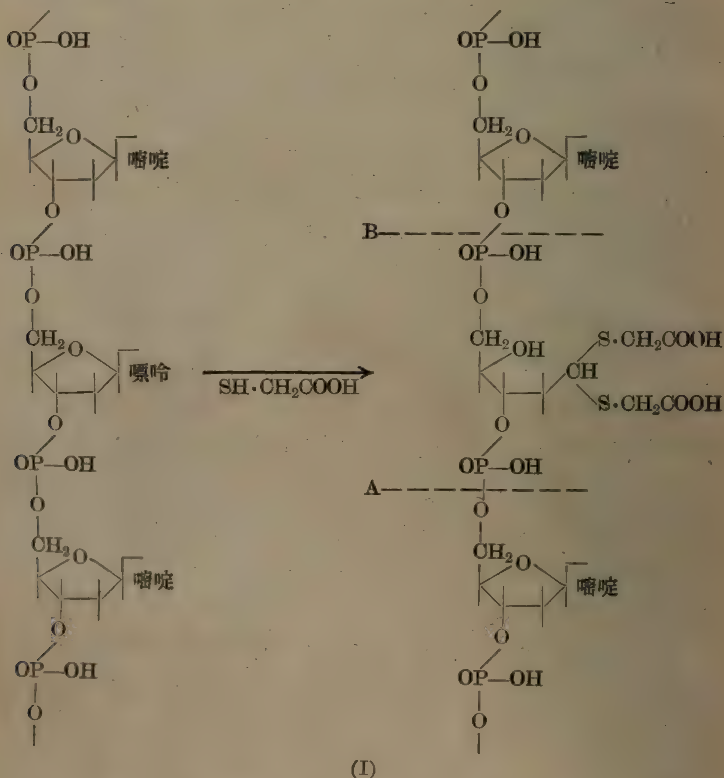
定量的。后一个异构体水解后生成 pC* 和 pA*。 从[CC]，亦即 pCpC 水解的研究，发現优先生成的是二磷酸盐 pCp，因此表示出在这含有二个胞嘧啶的核苷酸中，单磷酸化的一个比二磷酸化的一个对酸較为不稳定。同样，从一个含有次序异构体 pCpT 和 pTpC 混合物的二核苷酸[TC]水解的研究，可以断定在嘧啶核苷的苷鍵中，含有胞嘧啶的苷鍵比含有胸腺嘧啶的苷鍵較为不稳定[7]。

Shapiro 和 Chargaff[12,18] 应用了从二核苷酸的水解行为所得的結論来解釋脱氧戊糖核酸的酸水解。水解是在 100°C 下在 0.1 *M* 硫酸溶液中进行的，而水解产物則在一定的时間間隔(30、60 和 120 分钟) 內加以分析。时間間隔的判定以剛能完成分开这两个进行的水解反应为准：(1) 比較快地产生嘧啶核苷二磷酸，这些嘧啶核苷二磷酸是从两边被嘌呤核苷酸所包圍的嘧啶核苷酸而来的和(2)比較慢地产生嘧啶核苷二磷酸，这些嘧啶核苷二磷酸是从与其他一个或两个嘧啶核苷酸相邻的嘧啶核苷酸而来的。Shapiro 和 Chargaff 研究几个不同核酸样品后断定在核酸中嘌呤和嘧啶脱氧核苷酸并不是有規則地分布着。所得的証据对証明在多核苷酸鏈中有脱氧嘧啶多核苷酸区和脱氧嘌呤多核苷酸区的存在更为有利。并且事实証明，不是脱氧胞嘧啶多核苷酸排列次序的平均长度大于脱氧胸腺嘧啶多核苷酸排列次序的平均长度，就是脱氧胞嘧啶多核苷酸更常出現。这些結果与 Cohn 和 Volkin[19] 所得的結果相一致，他們用离子交换层析法从脱氧戊糖核酸的酸水解产物中分离出脱氧胞嘧啶核苷酸和脱氧胸腺嘧啶核苷酸的所有可能存在的各种单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸。

在 Shapiro 和 Chargaff 与 Cohn 和 Volkin 进行研究之前，Tamm、Shapiro、Lipshitz 和 Chargaff[20] 从无嘌呤酸的碱降解产物的研究中曾提出在脱氧戊糖核酸中有脱氧嘧啶多核苷酸排列次序的存在。顾名思义，无嘌呤酸是从多核苷酸經过对酸不稳定的嘌呤 N-苷鍵的断裂后除去所有的嘌呤殘基而产生的，因此脱氧戊糖磷酸殘基代替了原来存在于核酸中的脱氧嘌呤核苷酸。虽然原来

* 原书为 Cp 和 Ap，应为 pC 和 pA (譯者注)

的温和酸水解产物是高度降解的，但 Tamm、Hodes 和 Chargaff[21] 仍能得到分子量約为 15,000 的物质。如果将羧甲硫縮醛基 (carboxymethylmercaptal groups) 代替脫氧戊糖核酸中的嘌呤碱而不象在生成无嘌呤酸时将其除去，則所生成的脫氧戊糖核酸衍生物必将含有原来与嘌呤碱相結合的脫氧戊糖部分，这个戊糖部分是以开鏈形式出現的(参看 I)。这样将有一个羥基与 3′-和 5′-磷酸酯基邻接。根据戊糖核酸碱水解的机制(参看第八章)，这样的結构对碱是不稳定的，所以用碱降解时，就会得到含有完整的嘧啶核苷酸的碎片。



(I)

Jones 和 Letham[22,23] 在存在有无水氯化鋅和无水硫酸鈉的条件下，用巯基乙酸处理小牛胸腺的脫氧核糖核酸，并发現嘌呤几

乎全部地被羧甲硫基所取代，并且产生醛基无嘌呤酸双（羧甲）硫基縮醛〔aldehydoapurinic acid di (carboxymethyl) thioacetal〕(I)。将这个化合物用稀碱溶液进行碱水解时則产生可透析的碎片。这些碎片已由 Jones 和 Letham[22] 与 Jones、Letham 和 Stacey[24] 用紙层析和电泳方法分离出来。經鉴定，这些碎片多半是二脫氧嘧啶核苷酸和三脫氧嘧啶核苷酸的衍生物。因此这些結果与脫氧戊糖核酸水解的結果相一致，即在多核苷酸鏈中存在着脫氧嘧啶多核苷酸的排列次序。将小牛胸腺与草分枝杆菌 (*Mycobacterium phlei*) 的脫氧戊糖核酸所得到的醛基无嘌呤酸双（羧甲）二硫基縮醛的碱水解产物的組成作比較时，可以看出这两个核酸的脫氧嘧啶多核苷酸部分有明显的差别[25]。Kent、Lucy和 Ward[26] 曾描述了除去嘌呤碱而同时釋出无环状还原糖的另一个方法，他們用乙硫醇和盐酸进行反应时从鯡魚卵的脫氧戊糖核酸得到了一个二乙硫醇縮乙醛 (diethyl dithioacetal)。当与用巯基乙酸的反应相比較时，这个方法产生較大程度的核酸降解。虽然如此，在水解产物中仍能檢查出脫氧嘧啶多核苷酸。

总結上面关于用三种不同方法所得的脫氧戊糖核酸中核苷酸排列次序的結論，似乎可以十分肯定：每个脫氧核糖核苷酸在沿着多核苷酸鏈的某处都有其他的脫氧核糖核苷酸与之相邻接。也有直接的証据証明脫氧嘧啶核苷酸是以脫氧嘧啶多核苷酸的形式存在或至少以等于三个核苷酸长度的脫氧嘧啶多核苷酸‘堆’存在。从以氫鍵連接的双螺旋中的嘧啶碱和嘌呤碱的互补性质以及从核酸的組成来看，嘌呤碱同样必須以脫氧嘌呤多核苷酸的形式存在。这些結果都是从未分級分离的脫氧戊糖核酸中得到的。很可以怀疑，到底这样的研究对单独的組分是否会导致更有价值的启发。只有 Hodes 和 Chargaff 进行过分級分离后的物质的研究[27,28]，他們从分步解离的核組蛋白所得的脫氧戊糖核酸組分中分离出无嘌呤酸（参看第三章）。这些組分也曾用胰脫氧核糖核酸酶水解，并将不能透析的組分进行了分析。对这三个組分的惟一的一致变化是殘基中胞嘧啶的相对减少。这个工作只是十分初步的，还需要

对更高分級分离的物质作进一步的研究。

对核苷酸排列次序研究具有重要意义的一个有趣的最新发展是 Razzell 和 Khorana[29](参看 Heppel 和 Rabinowitz[30]的报告)的观察，即純化的蛇毒二酯酶能以分步方式降解五胸腺嘧啶核苷四磷酸(TpTpTpTpT，由胸腺嘧啶核苷-5′-磷酸先用化学聚合方法继用磷酸单酯酶除去末端磷酸基制得)。降解作用是从未酯化的 3′-羥基的一端开始。另一方面，小牛脾脏的二酯酶亦能以分步方式降解这个分子，但从另一端开始，即从具有自由的 5′-羥基的一端开始。

嘌呤和嘧啶脱氧戊糖核苷酸以多嘌呤和多嘧啶排列次序存在于核酸中的观察着重説明这些聚合基团在随意聚合作用中出現的頻率。Peacocke 根据随意分布的情况曾用下述方法对嘧啶排列次序进行了計算(参考 Jones、Stacey 和 Watson[25] 的报告)。让我們假定脱氧戊糖核酸中有大量綫性排列，每个排列中含有 $N/2$ 个嘌呤碱和 $N/2$ 个嘧啶碱，其中每一位置被一个嘌呤或一个嘧啶占据的机会相等。后一条件符合这样的要求，即脱氧戊糖核酸中腺嘌呤和鳥嘌呤殘基的总数必須与胞嘧啶和胸腺嘧啶殘基的总数相等。

n 个嘧啶排列的数目为 $N/2^{n+2}$，即一个、二个和三个嘧啶排列的数目分别为 $N/2^3$、$N/2^4$ 和 $N/2^5$。在所有长度为 n 的不間断的排列中，嘧啶的总数为 $Nn/2^{n+2}$。若 $N \gg n$，而 N 单位的排列数目非常大时，则在 N 单位的某一排列中，嘧啶的平均总数将如开始时所假定的：

$$N\sum_{0}^{\infty} n/2^{n+2}=\frac{1}{2}N$$

因此单独出現($n=1$)的嘧啶碱分数将为 $N/2^3 \div N/2=\frac{1}{4}$，而成对出現($n=2$)的嘧啶碱分数将为 $2N/2^4 \div N/2=\frac{1}{4}$。所以出現在排列大于 2 (即 $n>2$) 的嘧啶碱分数将等于 $\frac{1}{2}$。

設嘧啶碱的分数，即胞嘧啶和胸腺嘧啶的分数各为 c 和 t，则

在脱氧戊糖核酸中 $c+t=1$。对单独的嘧啶碱单位来讲，以胞嘧啶出现的嘧啶分数将为 $c/4$；以胸腺嘧啶出现的嘧啶分数将为 $t/4$。

对两个嘧啶碱組成的单位来讲，$c^2/4$ 将以 CC 排列次序出現、$2ct/4$ 将以 CT 排列次序出現和 $t^2/4$ 将以 TT 排列次序出現。对含有 n 个核苷酸的单位来讲，不同排列次序的比例可用展开 $(c+t)^n=1$ 而得到。

因此在一个多核苷酸中可以推测到有一种类型的核苷酸聚合单位存在。这些聚合体单位在这个多核苷酸中的存在，除需要的理論量外，并不象在其他多核苷酸中的那样重要。它們中存在的量与理論量的确有所不同，并且是决定于脱氧戊糖核酸的来源，現表示在表 27 中。

表 27 *M. phlei* 和小牛胸腺的醛基无嘌呤酸双(羧甲)二硫基縮醛的碱水解产物的組成

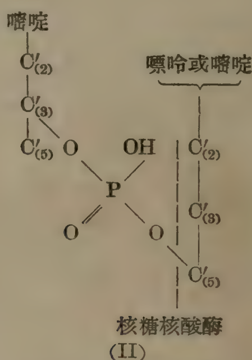
嘧啶排列次序	*M. phlei*		小牛胸腺	
	观察值	理論值	观察值	理論值
T	2.0	7.8	3.0	13.8
C	4.0	17.3	2.0	11.3
TC	3.0	10.6	4.5	12.4
TT	0	2.5	2.0	7.6
CC	1.5	11.9	1.5	5.1

(A. S. Jones, M. Stacey 和 B. E. Watson: *J. chem. Soc.* 1957, 2455 頁)

戊糖核酸中核苷酸的排列次序

戊糖核酸中核苷酸排列次序的研究是紧密地遵循着上面所描述的对脱氧戊糖核酸的研究方法，只是沒有无嘌呤酸的戊糖类似物存在。Schmidt 及其同工者[31~33] 指出胰核糖核酸酶(核糖核酸酶 I) 具有高度专一性，只能水解嘧啶核苷 3′ 位上的磷酸基团和相邻的嘌呤或嘧啶核苷酸的 5′-羥基間的鍵，卽断裂出現在如(II)中所示的专一位置上。虽然 Markham 和 Smith[34,35] 与 Volkin 和

Cohn[36] 曾指出在核糖核酸酶的作用过程中有中間产物 2′, 3′-环磷酸形成，但这个事实并不改变表示在(II)中的水解专一性。核糖核酸酶对戊糖核酸的长时間作用会使 60% 左右的嘧啶碱以 2′-或 3′-单核苷酸的形式釋出，剩余的嘧啶核苷酸仍通过 5′ 位与嘌呤核苷酸或多核苷酸相連〔参看結构 (III)，第十二章，285 頁〕。由于核糖核酸酶的专一作用，显然，象 Schmidt 及其同工者[32] 首先所指出的，在核糖核酸酶的消化产物中嘧啶单核苷酸的釋出必然表示这些核苷酸的很大部分是以嘧啶多核苷酸‘块’或‘堆’存在于核酸中。例如，若核酸中所有的嘧啶核苷酸都以二嘧啶核苷酸存在，則在核糖核酸酶的作用下将釋出 50% 嘧啶核苷酸。釋出 60% 左右这一事实必然表示某些‘块’的长度必須大于两个核苷酸的长度。这样出現在核酸中的嘧啶核苷酸当与已知組成的核酸联系起来时，亦将导致嘌呤核苷酸必須亦以相似的‘堆’的形式出現的結論。



(II)

Markham 和 Smith[35]（参看第四章，84 頁）用紙层析和电泳方法及 Volkin 和 Cohn[36] 用离子交换层析方法曾成功地分級分离出由核糖核酸酶作用所产生的幷含有具有嘧啶末端的所有嘌呤核苷酸的寡核苷酸。用离子交换层析法 (Dowex 1 层析柱，2% 交联度) 从小牛肝的戊糖核酸所得到的寡核苷酸的典型分离表示在图 80。分离出来的二核苷酸和三核苷酸以及在某种情况下所分离出来的含有更多核苷酸的寡核苷酸可由类似于前述用于証实二脫

氧核糖核苷酸的方法，用单酯酶、二酯酶和碱水解来鉴定。但是，由于戊糖寡核苷酸可被碱水解，而脱氧核糖寡核苷酸则否，因此操作上有些不同。特殊的例子将加以描述并附以文献[36]。

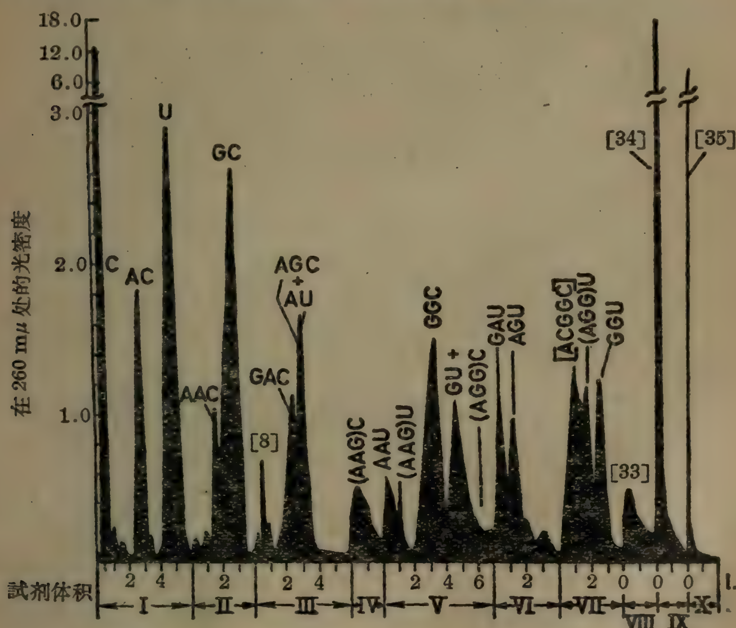


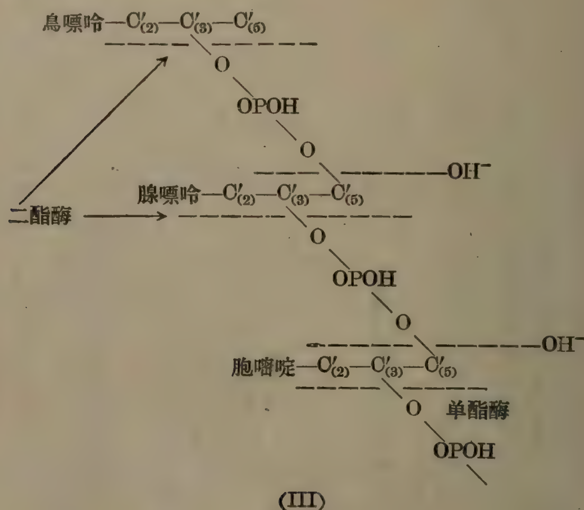
图 80　核糖核酸酶消化小牛肝的核糖核酸的产物的离子交换分离
(E. Volkin 和 W. E. Cohn: *J. biol. Chem.* 1953, **205**, 774 頁)

单酯酶、二酯酶和碱对三核苷酸 GpApCp* 的作用表示在(III)中。用碱水解将产生鳥嘌呤核苷酸和腺嘌呤核苷酸的 2′ 和 3′ 异构体的混合物以及只是 3′ 异构体的胞嘧啶核苷酸。用单酯酶除去末端磷酸基团后就会生成这样一种产物，将其用碱水解时，则产生胞嘧啶核苷以及腺嘌呤核苷酸和鳥嘌呤核苷酸的 2′ 和 3′

---

* 表示多核苷酸的結构系采用与脫氧多核苷酸相同的命名。因此核苷是用英文开始字母代表：A＝腺嘌呤核苷；G＝鳥嘌呤核苷；C＝胞嘧啶核苷；U＝尿嘧啶核苷。酯化的磷酸基的位置，若連于某一核苷的 3′ 羥基上則用放在核苷符号右边的 p 表示；若連于 5′ 羥基上，則將 p 放在左边。当不想区别次序异构体时，則包括該核苷酸的核苷的符号放在方括号內

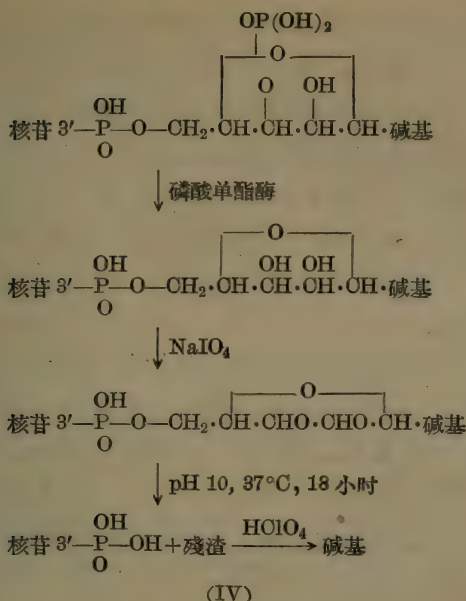
异构体。若将这个同样的产物用二酯酶水解，則产生鳥嘌呤核苷以及腺嘌呤和胞嘧啶-5′-磷酸。这些降解作用使人們有可能来解釋由核糖核酸酶水解所产生的所有二核苷酸和三核苷酸的結构以及某些較高級多核苷酸的結构。



(III)

Whitfield 和 Markham[37,38] 发展了另一个鉴定二核苷酸和三核苷酸的方法。Brown、Fried 和 Todd[39] 分别建議了一个类似的方法来測定核苷酸的排列次序。这个用于測定二核苷酸和三核苷酸結构方法的步驟見結构 (IV)。首先是用单酯酶除去末端磷酸基团。这将导致所生成的二核苷单磷酸的一个戊糖基的 2′ 和 3′ 位上的自由羥基的存在。用过碘酸鈉将其氧化則得到二醛的衍生物，这个衍生物在 pH 10 及 37°C 水解 18 小时則产生一个核苷酸和一个化合物，这个化合物用过氯酸水解能产生游离的嘧啶碱或嘌呤碱。鉴定这个核苷酸和碱基可得到二核苷酸的結构。

这个方法显然可用于任何一个多核苷酸的均匀制品而使其分步降解，并通过碱基的釋放来鉴定核苷酸。但是，这个方法并沒有广泛地应用于二核苷酸和三核苷酸結构的測定。大多数測定結构的方法是应用酶促水解和碱水解。



(IV)

因为在戊糖核酸中有四种核苷酸，因此在二核苷酸中就有 16 种可能的核苷酸排列次序。理論上，这 16 种排列次序允許有 32 个二核苷酸存在，每一排列次序有 2 个。因此由腺嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸 (3′ 和 5′ 异构体) 間所形成的二核苷酸就有下列异构体：pCpA、CpAp、pApC、ApCp。在这些异构体中，只有最后一个可由核糖核酸酶作用于戊糖核酸而产生，因为末端的磷酸基团必須在一个嘧啶核苷的 3′ (或 2′) 位上。因此 Markham 和 Smith[35] 与 Volkin 和 Cohn[36] 在核糖核酸酶消化产物中只找到二核苷酸：ApCp、GpCp、ApUp 和 GpUp。但是，另外四个排列次序的二核苷酸，即 ApGp、GpAp、GpGp 和 ApAp 亦曾在三核苷酸：ApGpUp、ApGpCp、GpApUp、GpApCp、GpGpUp、GpGpCp、ApApUp、ApApCp 中鉴定出来。这些三核苷酸亦曾从核糖核酸酶的水解产物中分离出来。其余 8 种可能的核苷酸排列次序曾由 Merrifield 和 Woolley[40] 与 Cohn 和 Markham[41] 从酵母核糖核酸的酸水解产物中得到。他們将此种核酸用 6 M 盐酸在 20°C 时

处理 2.5 分钟，然后加以中和，再将所生成的多核苷酸用离子交换[40]或紙层析[41]分离。酸水解明显地使連接多核苷酸間的鍵随便断裂，不管它們是否含有嘌呤核苷酸或嘧啶核苷酸。象被核糖核酸酶切断一样，断裂发生在相同的位置，即在 3′-磷酸基和相邻核苷酸的 5′-羥基間的鍵上。因此 Merrifield 和 Wooley 分离出了二核苷酸 ApCp、CpAp、GpCp、CpCp 和 [UC][40]，而Cohn 和 Markham[41] 則鉴定出其余排列次序的二核苷酸 UpAp、CpGp、UpGp 和 UpUp。

因为病毒核酸本身具有感染力和病毒核酸与从組織中提取的核酸进行比較时是均一的，所以病毒戊糖核酸中核苷酸排列次序的研究具有特殊的意义。Reddi[42] 最近研究了从不同株的烟草花叶病毒用胰核糖核酸酶和微球菌磷酸二酯酶消化所得的寡核苷酸的結构。和其他戊糖核酸相同，用核糖核酸酶消化烟草花叶病毒核酸亦能使嘧啶单核苷酸釋出[43]。所以嘧啶核苷酸必須以嘧啶多核苷酸‘堆’存在于多核苷酸鏈中。只有 3 个二核苷酸 ApCp、ApUp 和 GpUp 与三核苷酸 ApGpCp 曾从消化产物中分离出来，虽然其中还很可能存在有其他的三核苷酸，但尙未分离出来。在微球菌磷酸二酯酶的消化产物中曾发現有二核苷酸 ApCp、ApUp、ApGp、ApAp、UpGp、UpCp 和 UpUp，这些排列次序的結构尙不能作出肯定性的測定，因为这个酶的水解专一性尙不知道。

特别感兴趣的是不同株病毒核酸中核苷酸的各种排列次序的相对量。TMV、HR 和 M 这三个株含有相同的碱基組成，但在这三个株中由核糖核酸酶长时間消化所釋出的胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸的量則不同(表 28)，这表明在这三个株中的嘧啶核苷酸的‘堆’的排列不同。此外，从这三个病毒核酸的消化产物中所分离出来的三个二核苷酸和一个三核苷酸的量亦有明显的差别(表 29)。这証明在这三个不同株的病毒核酸中核苷酸的排列次序是不同的，并且亦首次直接支持以下的見解：病毒的不同生物活性与多核苷酸鏈中的核苷酸排列次序有关。

表 28 不同株烟草花叶病毒戊糖核酸的胰核糖核酸酶消化产物中的胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸的量

株	单核苷酸占核酸中总核苷酸的百分率	
	胞嘧啶核苷酸	尿嘧啶核苷酸
TMV	45.7	50.7
HR	42.0	48.1
M	61.2	70.8

(摘自 K. K. Reddi: *Biochim. biophys. Acta* 1957, **25** 531 頁)

表 29 不同株烟草花叶病毒的戊糖核酸的胰核糖核酸酶消化产物中的二核苷酸和三核苷酸的量

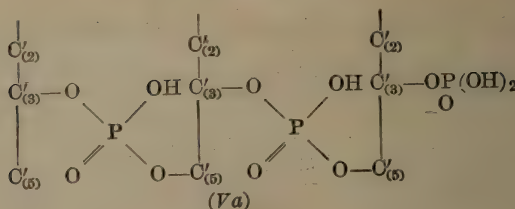
(以 μg/mg 核酸表示)

株	ApCp	ApUp	GpUp	ApGpCp
TMV	39.4	44.8	47.6	85.3
HR	35.6	40.8	55.1	72.9
M	44.3	46.8	48.9	72.6

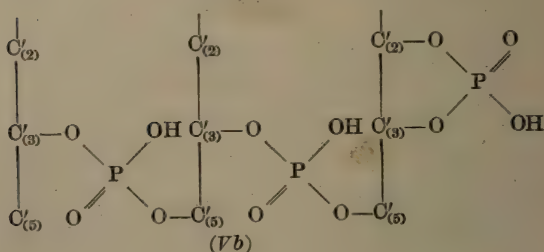
(K. K. Reddi: *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1959, **45**, 298 頁)

末端磷酸基团

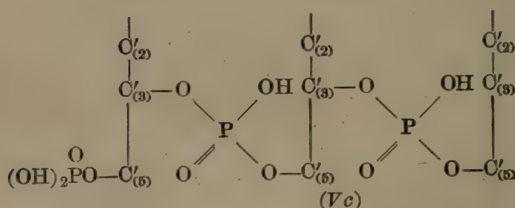
假使存在有末端磷酸基团的話，則末端磷酸基团可位于3′(或2′)上(*Va*)或多核苷酸鏈另一端的 5′ 位上(*Vc*)。若位于 3′(或 2′)上，則末端磷酸基团有可能以 2′, 3′ 环型 (*Vb*) 出現。假使这些分子式(*V*)代表核酸同系物的眞实結构，則結构(*Va*)和(*Vb*) 可认为是从核苷-3′-磷酸形成，而結构 (*Vc*) 是从核苷-5′-磷酸形成。在戊糖核酸中这些結构的存在可由分析鹹水解或核糖核酸酶水解的产物加以檢出，因为当 (*Va*) 和 (*Vb*)仅能形成-3′-磷酸时，則(*Vc*)会产生核苷-3′, 5′-二磷酸。Markham 和 Smith[44] 发現在酵母和蕪菁黃化花叶病毒核糖核酸的鹹水解产物中沒有核苷二磷酸，因



(*Va*)



(*Vb*)



(*Vc*)

此认为这些核酸的結构可用(*Va*)或(*Vb*)代表。但是,在烟草花叶病毒和馬鈴薯病毒 X 的戊糖核酸中,Markham、Matthews 和 Smith[45] 发現含有所有的核苷二磷酸,因此断定在这些核酸中大部分的末端磷酸基团是在 5′ 位上。

(陶鴻根 譯)

参 考 文 献

[1] Volkin, E., Khym, J. X. and Cohn, W. E. *J. Amer. chem. Soc.* 1951, **73**, p. 1533

[2] Schmidt, G. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 562

[3] Sinsheimer, R. L. and Koerner, J. F. *J. Amer. chem. Soc.* 1952, **74**, p. 283

[4] Smith, J. D. and Markham, R. *Biochim. biophys. Acta* 1952, **8**, p. 350

[5] Smith, J. D. and Markham, R. *Nature, Lond.* 1952, **170**, p. 120
[6] Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1954, **208**, p. 445
[7] Sinsheimer, R. L. *J. biol. Chem.* 1955, **215**, p. 579
[8] de Garilhe, M. P. and Laskowski, M. *J. biol. Chem.* 1956, **223**, p. 661
[9] Shapiro, H. S. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **26**, p. 596
[10] Sinsheimer, R. L. and Koerner, J. F. *Science* 1951, **114**, p. 42
[11] Sinsheimer, R. L. and Koerner, J. F. *J. biol. Chem.* 1952, **198**, p. 293
[12] Shapiro, H. S. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **26**, p. 608
[13] Levene, P. A., *see* Levene, P. A. and Bass, L. W. *The Nucleic Acids*: Chemical Catalog Company, New York, 1931
[14] Levene, P. A. and Jorpes, E. *J. biol. Chem.* 1929, **81**, p. 575
[15] Brown, D. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1952, p. 52
[16] Dekker, C. A., Michelson, A. M. and Todd, A. R. *J. chem. Soc.* 1953, p. 947
[17] Brown, D. M. and Todd, A. R. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 409
[18] Shapiro, H. S. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **23**, p. 451
[19] Cohn, W. E. and Volkin, E. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **24**, p. 359
[20] Tamm, C., Shapiro, H. S., Lipshitz, R. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1953, **203**, p. 673
[21] Tamm, C., Hodes, M. E. and Chargaff, E. *J. biol. Chem.* 1952, **195**, p. 49
[22] Jones, A. S. and Letham, D. S. *Biochim. biophys. Acta* 1954, **14**, p. 438
[23] Jones, A. S. and Letham, D. S. *J. chem. Soc.* 1956, p. 2573
[24] Jones, A. S., Letham, D. S. and Stacey, M. *J. chem. Soc.* 1956, p. 2579
[25] Jones, A. S., Stacey, M. and Watson, B. E. *J. chem. Soc.* 1957, p. 2454
[26] Kent, P. W., Lucy, J. A. and Ward, P. F. V. *Biochem. J.* 1955, **61**, p. 529
[27] Hodes, M. E. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **22**, p. 348
[28] Hodes, M. E. and Chargaff, E. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **22**, p. 361
[29] Razzel, W. E. and Khorana, H. G. *J. Amer. chem. Soc.* 1958, **80**, p. 1770
[30] Heppel, L. A. and Rabinowitz, J. C. *Annu. Rev. Biochem.* 1958, **27**, p. 613
[31] Schmidt, G., Cubiles, R. and Thannhauser, S. J. *J. cell. comp. Physiol.* 1951, **38**, Supplement 1, p. 61
[32] Schmidt, G., Cubiles, R., Zöllner, N., Hecht, L., Strickler, N., Seraidarian, K., Seraidarian, M. and Thannhauser, S. J. *J. biol. Chem.* 1951, **192**, p. 715
[33] Schmidt, G. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 560
[34] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 552

[35] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 558
[36] Volkin, E. and Cohn, W. E. *J. biol. Chem.* 1953, **205**, p. 767
[37] Whitfield, P. R. and Markham, R. *Nature, Lond.* 1953, **171**, p. 1151
[38] Whitfield, P. R. *Biochem. J.* 1954, **58**, p. 390
[39] Brown, D. M., Fried, M. and Todd, A. R. *Chem. & Ind.* 1953, p. 352
[40] Merrifield, R. B. and Woolley, D. W. *J. biol. Chem.* 1952, **197**, p. 521
[41] Cohn, W. E. and Markham, R. *Biochem. J.* 1956, **62**, p. 17P
[42] Reddi, K. K. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1959, **45**, p. 293
[43] Reddi, K. K. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **25**, p. 528
[44] Markham, R. and Smith, J. D. *Biochem. J.* 1952, **52**, p. 565
[45] Markham, R., Matthews, R. E. F. and Smith, J. D. *Nature, Lond.* 1954, **173**, p. 537

第十四章　合成的多核苷酸

直到最近为止，关于多核苷酸合成的机制还知道得很少。Ochoa 及其同工者所发現的一种能催化从核糖核苷-5′-二磷酸可逆地合成核糖多核苷酸的酶和 Kornberg 及其同工者所发現的一种能催化脫氧核糖核苷-5′-三磷酸摻入脫氧核糖核酸的酶，已使我們对于合成多核苷酸的知識有了显著的进展。并且我們已能利用合成的多核苷酸以供研究，并将其与天然存在的核酸作比較。

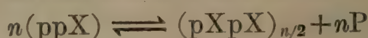
合成的核糖多核苷酸

核糖多核苷酸的合成

在研究生物体磷酸化机制的过程中，Grunberg-Manago 和 Ochoa[1] 观察到 *Azotobacter vinelandii* 的提取物能催化 P^{32} 标記的正磷酸与腺嘌呤核苷、次黄嘌呤核苷、尿嘧啶核苷、胞嘧啶核苷的 5′-二磷酸(焦磷酸)的末端磷酸的快速交換，和催化 P^{32} 标記的正磷酸与鳥嘌呤核苷-5′-二磷酸的較慢交換。这个需要鎂离子存在的交換反应常伴随着正磷酸的釋出。Grunberg-Manago 和 Ochoa[2] 随即观察到在鎂离子的存在下，将部分純化的酶与次黄嘌呤核苷-5′-二磷酸保温时有 60% 至 80% 的核苷二磷酸失去，同时放出等化学量的正磷酸并形成一聚合物。若用碱水解这个聚合物则生成 2′-和 3′-次黄嘌呤核苷酸，而磷酸二酯酶則水解这个聚合物，生成 5′-次黄嘌呤核苷酸。因此断定这个聚合物是次黄嘌呤多核苷酸，其中的核苷酸和在戊糖核酸中的一样，是通过一个 5′ 至 3′(或 2′)磷酸二酯鍵相連的。

被 *Azotobacter vinelandii* 的酶所催化的反应是可逆的[2]。在鎂离子的存在下，用这个酶与次黄嘌呤多核苷酸消化可产生次黄

嘌呤核苷二磷酸，因此这个反应可用下式表示*：



$$n(\mathrm{ppX}) \rightleftharpoons (\mathrm{pXpX})_{n/2}+n\mathrm{P}$$

在这个实例中，X 为次黄嘌呤核苷。但是，这个反应对次黄嘌呤核苷并不是专一的，而多核苷酸亦曾从腺嘌呤核苷、鳥嘌呤核苷、尿嘧啶核苷和胞嘧啶核苷的 5′-二磷酸制成。用两种或更多种不同的核苷-5′-二磷酸也已制得了混合的聚合物，例如多聚 AU 和多聚 AGUC[3]。这个反应利用了二磷酸中焦磷酸鍵的能量来形成多核苷酸鏈的二酯鍵。迄今还沒有得到关于在平衡位置的精确数据。但是，象在用多糖磷酸化酶的实例中一样，似乎平衡是受到正磷酸濃度对核苷二磷酸濃度之比的影响。用 ppA 和 ppI 作底物的初步实験[4]指出，当正磷酸与核苷二磷酸之比約为 1:1.5~2.0 时，反应达到平衡。在平常温度下的平衡位置因此是有利于多核苷酸的合成的，并且表示用酶水解多核苷酸中的磷酸二酯鍵的自由能低于核苷二磷酸中的焦磷酸鍵的自由能。但是，反应的迅速可逆性则指出这两个自由能之差不可能很大。

鉴于可逆的磷酸解可能是生物体系中多核苷酸生物合成和分解的重要机制，Grunberg-Manago 和 Ochoa[2] 曾建議把这种酶命名为‘多核苷酸磷酸化酶’。这种酶似乎广泛分布在自然界中[5]。多核苷酸磷酸化酶已由 Beers[6~10] 和 Olmsted[11] 从 *Micrococcus lysodeikticus* 的提取物中，Littauer 和 Kornberg[12,13] 从大腸杆菌中以及 Brummond, Staehelin 和 Ochoa[14] 从許多細菌中提取出来。

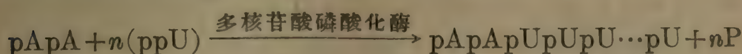
多核苷酸磷酸化酶在 pH 7.5 至 9.0 的范圍內具有最大活力[3]。但是它的活力，也就是聚合速率，不仅取决于 pH，同时也取决于核苷二磷酸、鎂离子和其他电解质的濃度[7,15,16]。高濃度的氯化鉀溶液有利于从 *Micrococcus lysodeikticus* 提取出来的多核苷酸

---

* 采用和前章相同的縮写，字母 A、G、U 和 C 代表相应的核糖核苷酸，另加 I＝次黃嘌呤核苷；因此 pX＝核苷-5′-磷酸，ppX＝核苷-5′-二磷酸（焦磷酸）。P 用作正磷酸的符号。多核苷酸将以多聚 A，多聚 C 等标出，而混合的多核苷酸則标以多聚 AU 等

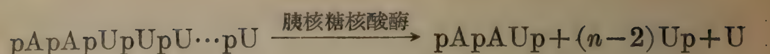
磷酸化酶的作用，这样的要求对于从 *Azotobacter vinelandii* 所得到的酶則不甚明显[3]。虽然鎂离子的存在对酶的作用是重要的，但高濃度鎂离子只是抑制而不是催化酶的作用[16]。早期的研究都是用不純的酶的提取物来进行的，所有这些提取物都含有核酸作为杂质。在这样的情况下，不可能肯定酶反应的机制，尤其是在决定是否需要一个引物来引起聚合作用时。Mii 和 Ochoa[17]曾获得高純度酶制品的样品。这种制品很可能只含有单一的酶。他們应用这种純粹的酶制品时发現 ppA 的聚合作用表現出一个自动催化时間曲綫，它具有起始的长潜伏期。这个潜伏期曾因多聚 A 的存在而消失，但并不因多聚 U 的存在而消失。同样，在 ppU 的聚合作用中，潜伏期因多聚 U 的存在而消失，但不因多聚 A 的存在而消失。

这样看来，引物和核苷二磷酸都需要有一个共同的碱基。虽然任何多核苷酸都能引导本身的合成，但是它們也能引导其他多核苷酸的合成，或对之不发生影响，或甚至于抑制其他多核苷酸的合成。因此多聚 C 的合成只能被多聚 C 所引导而强烈地被多聚 A、多聚 U、多聚 AGUC 和核糖核酸所抑制。反之，多聚 C 却能引导多聚 U、多聚 A 和多聚 AGUC 的合成。多核苷酸的引导效应机制至今尚未明了，但是从所观察到的专一性的征象来看，可知这种引导作用对于所合成的多核苷酸的本质具有直接影响[18]。这些結果中的几个已为 Singer、Heppel 和 Hilmoe[19] 所証实。此外他們又发現某些寡核苷酸也能当作引物，并可縮短起始的潜伏期。但是核苷单磷酸并沒有被发現可用作引物，虽然小至二聚合体的寡核苷酸仍能起这样的作用。寡核苷酸能起眞正的引物作用是由于它們能摻入聚合物作为聚合作用核心的緣故。例如：



$$\mathrm{pApA} + n(\mathrm{ppU}) \xrightarrow{\text{多核苷酸磷酸化酶}} \mathrm{pApApUpUpU}\cdots\mathrm{pU} + n\mathrm{P}$$

这个反应的証明是用核糖核酸酶消化所分离出来的聚合物，然后用紙上电泳方法回收和鉴定腺嘌呤，这个腺嘌呤含有連接一个尿嘧啶核苷殘基的引物，即：



$$\text{pApApUpUpU}\cdots\text{pU} \xrightarrow{\text{胰核糖核酸酶}} \text{pApAUp}+(n-2)\text{Up}+\text{U}$$

一个多核苷酸的典型制备方法如下[20]。于100 ml 0.5% 腺嘌呤核苷-5′-二磷酸溶液中，在pH 8.0时加入1.7 ml 0.5*M* 三羥甲基氨基甲烷使pH变为9.0；然后加入8.3 ml 0.01*M* 氯化鎂溶液，再加入3.3 ml 酶溶液。将混合物在37°C保温280分钟。用濃的氯化鉀溶液使聚合物沉淀出，再連續用70%、95%和无水酒精及乙醚加以洗滌。聚合程度可由改变酶对底物的比值[21]、加寡核苷酸作为引物以及改变保温的时間来控制。

核糖多核苷酸的核苷酸排列次序和組成

象在天然核糖核酸中的一样，合成的多核苷酸含有核苷-5′-磷酸，以3′,5′-磷酸二酯鍵互相連接起来。鏈的一端以磷酸基团为末端，其中一个羥基酯化在末端核苷的5′位置上，另一端則以一个含有自由的2′和3′位的核苷酸为末端。这个結构是由专一性的磷酸二酯酶的作用而証实的。这种酶作用于多核苷酸时則产生按照它們对核糖核酸所起的作用的产物。因此蛇毒二酯酶可使多核苷酸完全水解而产生核苷-5′-磷酸，而脾脏磷酸二酯酶則产生核苷-3′-磷酸并可能产生大概为末端的一个核苷-3′,5′-二磷酸。用碱进行水解，則通过2′,3′-环状磷酸而产生核苷-2′-磷酸和核苷-3′-磷酸的混合物。胰核糖核酸酶使嘧啶核苷-3′-磷酸与其相邻的核苷5′位置的鍵在5′一端断裂的专一作用，可以很好地从这个酶对多核苷酸的作用表現出来。这个酶不与多聚A或多聚I发生作用，但容易水解多聚U和多聚C，并且在徹底消化时使它們水解成为相应的核苷-3′-磷酸。短时期的消化則生成寡核苷酸。核糖核酸酶亦能水解多聚AU和多聚AGUC而产生一些嘧啶单核苷酸和含有所有的嘌呤碱和剩余下来的嘧啶核苷酸的寡核苷酸。

多聚AU和多聚AGUC中的核苷酸排列次序的类型和組成可从聚合物的酶促水解和碱水解，并采用如第十三章中所描述的对天然核酸所用的同样方法加以測定。从几乎等分子数量的ppA

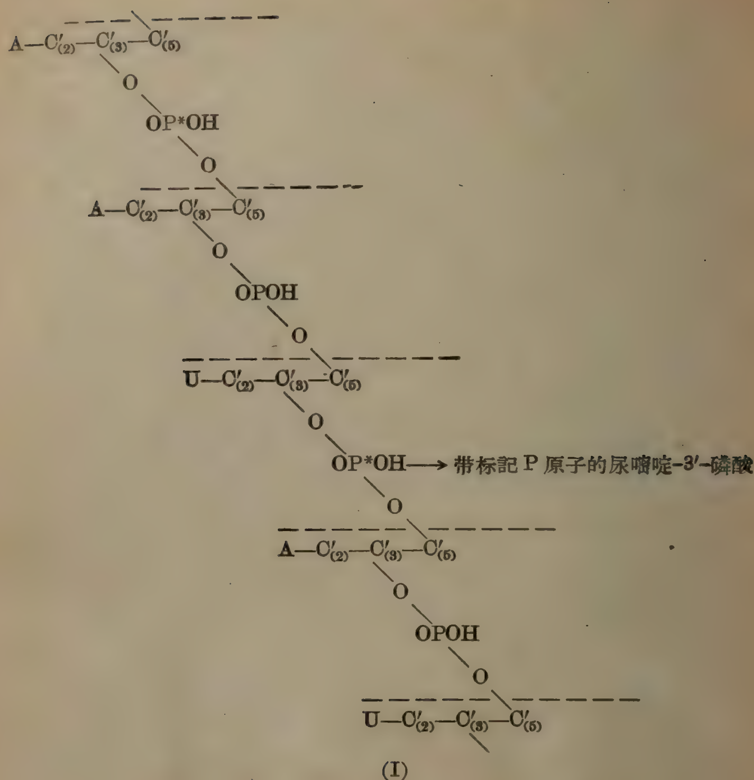
和 ppU(实际比値 ppA/ppU=1.06)制得的聚合物，其 A:P 的比値为 1.03 的多核苷酸，經胰核糖核酸酶彻底水解后，所得的产物的分析結果列在表 30 中。关于核苷酸排列次序的进一步的了解和証明是从多核苷酸的合成获得的。这些多核苷酸的合成采用了 P^{32} 标記在对酸稳定的磷酸基团上的腺嘌呤核苷-5′-二磷酸和未标記的尿嘧啶核苷-5′-二磷酸[4,5,22]。假使将多核苷酸用碱水解，則基于碱水解的机制，不論腺嘌呤核苷与尿嘧啶核苷相連的位置怎样，标記的磷酸将轉移到尿嘧啶核苷上〔参看(I)，$P^*=P^{32}$〕，以致在测定尿嘧啶核苷-3′-磷酸上出現的放射性就是对于一个多核苷酸中 A−U 連接鏈数目的估計。在 A:P 比値为 1.03 的多核苷酸中，曾发現在多核苷酸鏈中有 53% 的腺嘌呤核苷酸殘基的前面是連接着尿嘧啶核苷酸，而其余 47% 的殘基的前面必定是連接着腺嘌呤核苷酸。这个 UA 对 AA 次序的比例是十分接近于理論値 50% 的，并且可以作为加强这样的事实，即在多核苷酸中的腺嘌呤多核苷酸区和尿嘧啶多核苷酸区的生成是任意聚合的正常結果。

表 30 多聚 AU 的核糖核酸酶的消化产物

单核苷酸或寡核苷酸	占总产量的百分率
Up	38.0
ApUp	35.0
ApApUp	20.0
ApApApUp	4.9
ApApApApUp	2.1

〔S. Ochoa 和 L. A. Heppel: *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy 和 B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, 621 頁〕

关于多聚 AU 中核苷酸排列次序的进一步知識可以从标記的腺嘌呤核苷-5′-二磷酸和未标記的尿嘧啶核苷-5′-二磷酸所制备的聚合物的核糖核酸酶的消化得到。排列次序为 pUp*ApUp*Ap 的将被核糖核酸酶分解而产生在尿嘧啶核苷 3′ 位上有放射性磷酸基的 ApUp*，而排列次序为 pUp*ApUpUp 的将被分解为无标記



(I)

磷的 ApUp。因此，对于胰核糖核酸酶消化多核苷酸所釋出的二核苷酸 AU 的比放射活性的測定可以决定 UAUA 和 UAUU 排列次序的相对頻率。用同样方法能够測定其他排列次序的頻率。为了要得到出現于不同排列次序的单位数目，就必須知道鏈的平均长度。由于已經指出末端磷酸基是在 $C'_{(5)}$ 位而不在 $C'_{(3)}$ 位上[3,5]，因此鏈长可由端基分析来測定。綜合所得的数据就得到表 31 所列举的数值。Ochoa 和 Heppel[4] 并不认为已經得到了足够的数据，可以作詳細的分析来决定核苷酸的分布有无規律性。

核糖核酸酶消化多聚AGUC和消化天然核糖核酸的經过非常相似。消化后得到胞嘧啶核苷酸和尿嘧啶核苷酸以及許多寡核苷酸，其中曾被証实的有二核苷酸 AU、AC、GU 和 GC 以及三核苷酸

表 31 在多聚 AU 中核苷酸的排列次序
聚合物的平均鏈长，46 个核苷酸殘基

排列次序	殘基的数目如下				总数
UU	UUA	7.00	UUU	9.00	16.0
UAU	UAUA	8.10	UAUU	7.10	15.2
UAAU	UAAUA	4.60	UAAUU	4.10	8.7
UAAAU	UAAAUA	1.07	UAAAUU	1.03	2.1

〔S. Ochoa 和 L. A. Heppel: *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy 和 B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, 624 頁〕

AAU 和 AAC[4,5,23]。多聚 AGUC 的核苷酸組成已由 Smellie[24] 用紙层析方法加以测定，并与从微生物提取出来的天然核糖核酸的組成相比較(这些微生物能供給水解所需要的酶)。鳥嘌呤核苷-5′-二磷酸不易起聚合作用[3]。由于这个原因，Grunberg-Manago、Ortiz 和 Ochoa 在第一次制备多聚 AGUC 时，为了要增加酶与鳥嘌呤核苷二磷酸的比值，仅用这个核苷酸与其他核苷二磷酸相比的量的一半。这一低濃度和低速率的聚合作用明显地影响了鳥嘌呤核苷的掺入聚合物，象在表 32 中所指出的。在以后的制备中，他們用了等比例的核苷酸，鳥嘌呤核苷的掺入聚合物因而也就較多。多聚 AGUC 中和天然核糖核酸中所含的低量尿嘧啶(表 32)具有同等的意义。这似乎不仅酶对核苷二磷酸的濃度具有敏感性，而且在聚合作用中它还表現出显著的专一性。

表 32 多聚 AGUC (*Azotobacter vinelandii* 酶) 和 *Azotobacter vinelandii* 的核糖核酸的核苷酸組成

多核苷酸	腺嘌呤	鳥嘌呤	尿嘧啶	胞嘧啶
AGUC(1:0.5:1:1)	10.0	5.9	7.1	9.9
AGUC(1:1:1:1)*	10.0	12.7	4.2	11.1
Azotobacter 核糖核酸	10.0	13.0	7.3	9.0

* 用粗制的酶制备的低分子量的聚合物

〔摘自 S. Ochoa 和 L. A. Heppel: *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy 和 B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, 626 頁〕

Singer[25] 和 Ochoa[26] 曾分别研究过多核苷酸磷酸化酶对合成的多核苷酸磷酸解的作用。寡核苷酸的磷酸解比更高的聚合物[25] 的磷酸解緩慢得多。pApA 不与酶有显著的作用。将末端5′-磷酸基除去，例如在 ApApA 中的一样，会使磷酸解速率更为降低。对聚合物的結构具有更大意义的是 Ochoa[26] 的观察，即仅含一种核苷酸的合成的多核苷酸(例如多聚 U)，其磷酸解虽然既快而且彻底，但是多聚 AU、多聚 AGUC 和天然核糖核酸的磷酸解則十分緩慢[3]。这是因为大多数的这些分子是以多股鏈的形式存在于溶液中。它們与单股鏈的多聚 U 不同，可以抗拒多核苷酸磷酸化酶对它們的分裂作用。这些聚合物結构的重要情况将在下面作更詳細的討論(324 頁)。

核糖多核苷酸的大小和形状

各种合成的多核苷酸的分子量的测定已进行过多次，其結果摘录在表 33 中。这些分子量的数值可与天然核糖核酸制品的数值相比拟，并且非常接近于从 *Azotobacter vinelandii* 所得的天然核糖核酸的分子量[27]。多核苷酸的分子量也可以象由端基分析[33] 所测的一样，由平均的鏈长来测定。多聚 A 在中性或弱碱性溶液中用沉降方法和用端基分析方法所测得的分子量非常接近，但多聚 AU 和多聚 AGUC 用沉降方法所测得的分子量是 3×10^5 和 7×10^4，比用端基分析方法所测得的分子量 4×10^4 和 9×10^3 大得多。Ochoa[5] 认为这是由于混合的聚合物在溶液中产生了聚集作用，因而得到了高分子量的聚集体的緣故(参看下面)。但是也有大量的証据表明：在一定的溶液条件下，多聚 A 和多聚 C 也形成稳定的聚集体。

Fresco 和 Doty[21] 曾經改变酶与底物的比值和聚合的时間，制备了分子量范圍很大(1.5×10^4～1.3×10^5)的多聚 A 的样品。这些样品在 pH 6.5 以上的水溶液中或在 pH 5.7 以上的 0.15M 氯化钠溶液中显示出一个特殊的吸收光譜，其最大吸收值在 257 mμ 处(图 81)，并且所具的沉降常数和特性粘数决定于其分子量，象图 82 中左边所表示的。这些直綫的斜率与自由卷曲的鏈的斜

表 33 核糖多核苷酸的分子量

核糖多核苷酸	分子量	测定方法	参考文献
Azotobacter			
酶			
A*	7×10^4	沉降法	27
A*	1.48×10^5	光散射法	28
A	1.77×10^5	沉降法，扩散法	29
A	5.7×10^5	光散射法	30
M. lysodeikiticus			
酶			
A	1.86×10^6	光散射法	10
A	$1.6\sim2.6\times10^6$	光散射法	20, 31
A	$1.1\sim4.0\times10^6$	光散射法	32
Azotobacter			
酶			
U	7×10^4	沉降法	27
U	1.73×10^4	沉降法，扩散法	29
AU	3×10^5	沉降法	27
I	8×10^5	光散射法	30
AGUC	7×10^4	沉降法	27
A†	$1.5\times10^4\sim1.3\times10^5$	沉降法，粘度法	21
A‡	$1.5\times10^5\sim3.5\times10^6$	沉降法，粘度法	21

* 从相同制品的标本测定的

† 底物濃度不同的制品的数值范圍

‡ 聚集体的数值

率相一致。这一結果与 Steiner 和 Beers[20,31] 的結果相符合。在 pH 5 以下的 0.15*M* 氯化鈉溶液中和在 pH 6.5 以下的水溶液中，多聚 A 的样品具有不同的吸收光譜，其最大吸收值在 252 mμ 处[20,21,34](图 81)，并且所具的沉降系数值和特性粘数值决定于溶液的濃度和温度。在这个濃度和温度下，沉降系数和特性粘数的轉变可由降低 pH 来完成。在降低 pH 到 5.0 以下之前就将多聚 A 的濃度改变，則沉降系数和特性粘数随分子量的改变而改变，正象图 82 中右边所表示的。这种性质表示聚集作用曾經发生[21,34]，而直綫的斜率是表示样品种类的結构是属于同系物的結构，不同的分

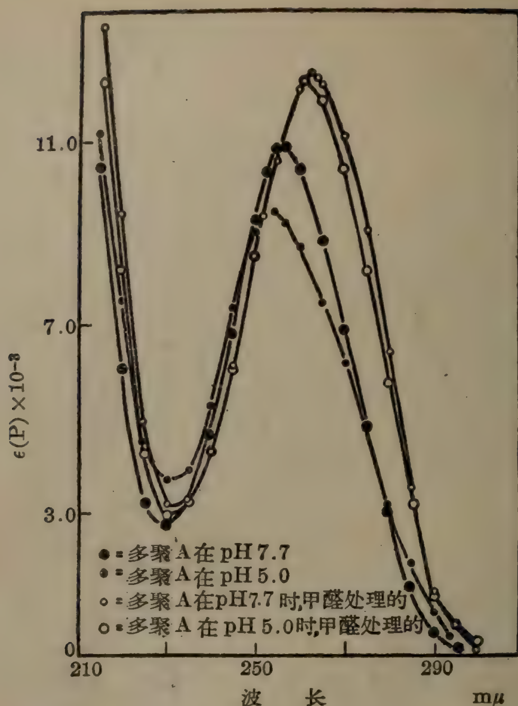


图 81 天然的和甲醛处理后的多聚 A 在中性和酸性 pH 的 0.01*M* 氯化鉀溶液中的紫外吸收光譜

(R. F. Beers 和 R. F. Steiner: *Nature, Lond.* 1957, **179**, 1077 頁)

子量則是由于綫性生长程度不同的結果(卽聚集)。和自由卷曲的构型不同,这个构型在除去氯化鈉时并不表現出比粘度[21]或均方末端距的显著增加[20]。这个結果使 Fresco 和 Doty[21] 断定这两个构型的轉变是明显的。并且若将剛型分子的溶液加热,約在 75°C 时卽轉变为自由卷曲型。这样就很容易使人回想到脫氧戊糖核酸的热变性(参看第十一章,260 頁)。

因此这似乎是多聚 A(也可能多聚 C 和多聚 I)在溶液中,在适当的条件下能結合成一聚集体。Fresco 和 Doty[21] 相信这个聚集体为一具有碱基对的不連續的(因为是从較小的多核苷酸所形成)双螺旋,和在固体状态时的相同(参看下面)。但是,假使是

图 82 多聚 A 的两种构型的沉降系数和分子量的依赖关系

在左边的曲綫，其溶剂为 0.15M 氯化鈉，0.015M 檸檬酸鈉，pH7.1；在右边的曲綫，其溶剂为 0.15M 醋酸鈉，pH4.9。空心圓圈代表无外加电解质的溶液在 pH 3.7 时测定的

(J. R. Fresco 和 P. Doty: *J. Amer. Chem. Soc.* 1957, **79**, 3928 頁)

这样的話，則所需要的 pH 条件，即低于 pH 5，将令人頗为惊奇，因为在这个 pH 下，要参加氫鍵形成的腺嘌呤的氨基，从其 pK_a' 值 (4.16) 来看和从 Steiner 和 Beers[20] 的滴定所闡明的事实来看，已电离成为带电的酸型。因此可以推测，与脫氧戊糖核酸的情况相似，以氫鍵連接的結构是被破坏而不是形成。但是，由于甲醛的存在而能够阻止聚集作用[20,31,32,34] 的事实更証实了 Fresco 和 Doty 的观点，即在双螺旋中的氫鍵是和存在于脫氧戊糖核酸中的属于同一类型。

所建議的固体纤維状的多聚 A 的結构是多聚 A 在溶液中可能形成双螺旋結构的进一步証据。象在下面所叙述的，X-射綫衍射的証据强有力地指出了双螺旋的存在，这个双螺旋在固体状态时因氫鍵的存在而变得稳定。

虽然对多聚 I 的溶液并没有象多聚 A 的溶液研究得那么彻

底，但是溶液性质的几个特征指出，这个聚合物能以两种形式存在：一种为有組織的螺旋結构，另一种为无規則的而且是无定形的一条单鏈[35]。多聚 I 溶液性质的变化和多聚 A 一样，是决定于 pH 和离子强度。增高 pH 会使消光系数增高，并使最大吸收从 249 mμ 处轉移到 254 mμ 处，其轉移方向和多聚 A 的轉移方向相同；同时，沉降常数从 pH 6.8 时的 6.75 下降至 pH 10.2 时的 2.45。同样，离子强度的增加亦使沉降系数和消光系数改变，这是聚集过程的表現。象将在下面所描述的，多聚 I 以纤維状态出現时可能形成一个三股氫鍵的螺旋体。因此可以断定多聚 I 和多聚 A 相似，在溶液中也以两种形式存在，即单鏈自由卷曲型和更剛硬的、氫鍵連接的三股螺旋体。Doty、Boedtker、Fresco、Haselkorn 和 Litt[36]最近証实了这一观点，他們曾观察到約在 42°C 时多聚 I 溶液的光密度有显著的增高（图 83）。相似的变化在脫氧戊糖核酸热变性中亦已观察到，并被 Doty 比拟为熔解的过程（参看第十

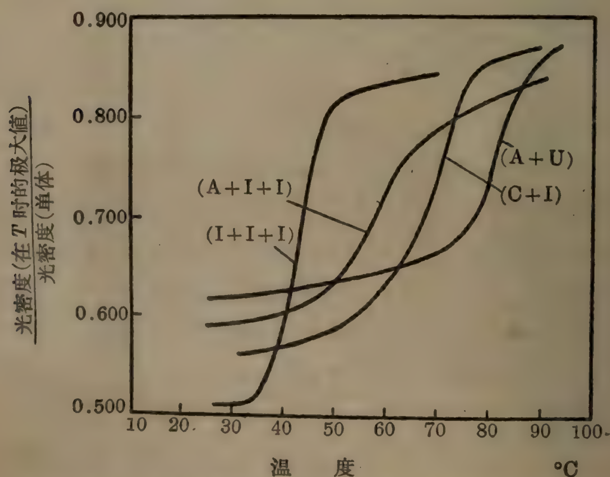


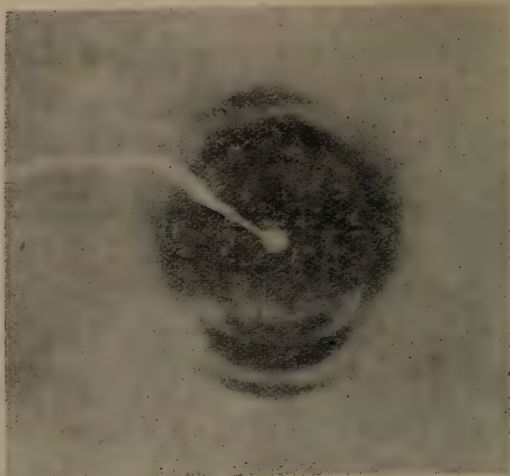
图 83　核糖多核苷酸复合物溶液的加热温度与光密度变化的关系
測定是在 pH 6 的、含有 0.002*M* 磷酸氫鈉的、0.1*M* 氯化鈉溶液中进行的
(P. Doty, H. Boedtker, J. R. Fresco, R. Haselkorn 和 M. Litt: *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1959, **45**, 488 頁)

一章，260 頁)。在这些临界温度所出現的构型变化是从一个具有高度規則的状态变为一个比較无規則的状态。所有的証据都指出这个变化是从一个以氫鍵連接的螺旋体变为糾纏在一起的自由卷曲构型。引起这个变化的温度是維持螺旋体的鍵的强度的象征，犹如固体的熔点是衡量分子鍵間或离子鍵間鍵的强度一样。多聚 I 的轉变温度是 42°C，比任何其他多核苷酸的轉变温度低，亦比核酸的轉变温度低。因此多聚 I 螺旋体不是一个特别稳定的聚集体。

从 X-射綫衍射研究所得到的多核苷酸的結构

人們已經得到了多聚 A、多聚 C、多聚 U、多聚 I、多聚 AU 和多聚 AGUC 的 X-射綫衍射图象。所有这些多核苷酸的纤維都可用抽出脫氧戊糖核酸纤維那样的方法(参看第九章)从濃溶液中抽出来。但是各种多核苷酸所产生的衍射图象并不一致，呈現出显著的結构上的差別。衍射图象可以很方便地归并为下列三个类型：(1)表現出无定形的衍射图象；(2)表現出与天然核糖核酸相似的衍射图象；和(3)表現出一个相当清晰的衍射图象，这个图象比天然核糖核酸的衍射图象更好，因此它表示一个高度有秩序的結构。多聚 U 属于第一类，其纤維很容易制得，它沒有双折射現象，而且产生一个无定形衍射图象，这就表明在它的分子中实际上并沒有重复結构的构造[37]。多聚 AU 和多聚 AGUC 属于第二类，其衍射图象和天然核糖核酸的衍射图象十分相似[37~39]。这些图象虽然比核糖核酸的图象有較好的定位，但其质量尙不够高，仍旧不能用以直接解釋多核苷酸的結构。虽然如此，这两种图象如此相似是很有意义的，因为它表示合成的聚合物能够具有和天然核糖核酸相象的构型。包括多聚 A、多聚 C 和多聚 I 的最后一类是进展最大的一类。所有这三种聚合物的 X-射綫照片都表示出高度有規則的結构，其中某些反射与核糖核酸照片的扩散带比較起来时是相当清晰的。

关于多聚 A[38] 和多聚 I[35] 的結构已进行过詳細的研究。



照片 7　一个多聚 A 纤維的 X-射綫衍射照象

〔J. D. Watson: *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy 和 B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, 554 頁〕

Watson[38] 根据多聚 A 的衍射图象(照片 7)沒有子午綫的反射，对它解释为是体現出一个螺旋結构。沿着纤維軸的重复距約为 15Å，而核苷酸的間距則为 3.75Å。单位結构的大小指出多聚 A 具有一条以上的多核苷酸鏈。在可能的两条鏈和三条鏈的模型中，从密度的数値来看，两条鏈的結构似乎更为可能。象脫氧戊糖核酸一样，在理論上多聚 A 有两种可能的結构，一种結构为两条多核苷酸鏈并不互相卷繞在一起，但处于各在一边的位置，另一种結构为两条鏈圍繞共同的軸而互相扭在一起。从 X-射綫衍射图象来考虑以及基于沒有定論的根据，上述的后一种結构更为合理。因此多聚 A 的結构被认为是一个双螺旋体[38]，象在脫氧戊糖核酸中的一样，糖-磷酸骨架是在分子的外面，而碱基則指向中心軸。氫鍵将位于同一平面上的腺嘌呤殘基对連接在一起，氫鍵所連的是第 10 位上的氨基氮原子和第 7 位上的游离的氮原子（图 84）。因此，腺嘌呤殘基是和盐酸腺嘌呤結晶体[40] 中的結构相似地排列着。在形成碱基对时仅涉及氨基中的一个氫原子，而另一个

氢原子就可能和对面鏈上磷酸基中未酯化的氧原子形成第二个氢鍵。虽然这个模型在許多方面滿足了X-射綫数据的需要，但仍是假定的。

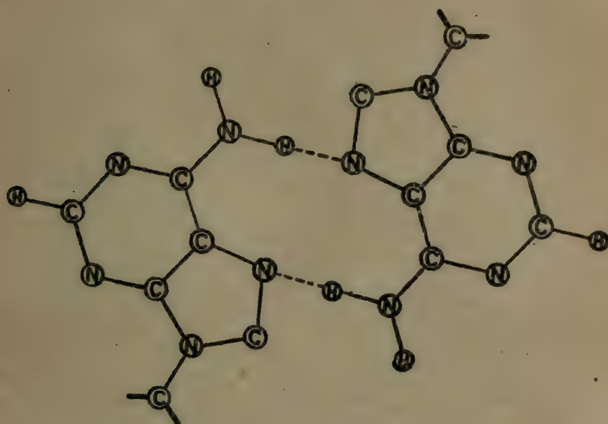


图 84 在多聚 A 中連接腺嘌呤殘基对的氢鍵

多聚 I 的 X-射綫衍射图象（照片 8）当与脱氧戊糖核酸或任何其他多核苷酸的 X-射綫衍射图象相比时，表現出許多罕有的特点[35]。图象中有三个分层的綫，其中两个是非子午綫，出現在 9.8Å 和 5.2Å 处，而第三个是一个非常强的子午綫的反射，出現在 3.4Å 处。这个后者的反射是和纤維軸成垂直的平面嘌呤环堆結合在一起的，象在許多其他天然的和合成的多核苷酸中的一样。Rich[35] 根据連續殘基間的螺旋式的旋轉对 X-射綫衍射图象作了解釋，即多聚 I 的纤維含有一个三股鏈的結构，其中的次黃嘌呤殘基是以氢鍵相連，正象图 85 所表示的。Rich[85] 认为必需排除两股鏈的模型，因为糖-磷酸基的骨架不可能充分伸出，使連續的多核苷酸間所需的螺旋旋轉角为 62.5°。为什么多聚 A 有这样的結构（参看上面）而与之十分相似的聚合物多聚 I 却沒有，現在尚不明了。結构的唯一差别只是氢鍵的本质不同。虽然还可能有一种四股鏈的模型，但必須舍弃，因为这样的分子会含有一个直徑約为 2.3Å 的中心孔，使分子的不稳定性大大增加。



照片 8　一个多聚 I 纤维的 X-射綫衍射照象

(A. Rich: *Biochim. biophys. Acta* 1958, **29**, 503 頁)

非常明显，根据 X-射綫衍射图象，某些合成的多核苷酸可以具有和从天然核酸中所观察到的有規則的結构一样的构型。因此上面所提到的 X-射綫衍射图象的分类，現在可以用結构的类型加以說明。凡是具有无定形图象的那些多核苷酸，如多聚 U，是以单股鏈自由的卷曲結构存在的；而那些属于(2)和(3)类型并表現出清楚图象的多核苷酸則具有以氫鍵連接的螺旋結构，其中包含着两条或三条多核苷酸鏈。X-射綫数据的解釋是和在溶液中发生的分子大小和形状的改变所得的結論相一致，特别是与 Warner[41] 的紫外吸收的测定結果非常吻合。在 pH 7 的无盐溶液中的多聚 A 在 258 mμ 处的消光系数〔ε(P)〕为腺嘌呤核苷酸的 61%，而多聚 U 的消光系数則为尿嘧啶核苷酸的 95%。增高多聚 A 溶液

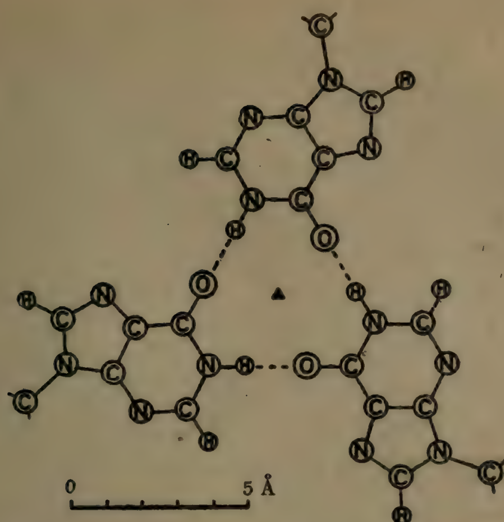


图 85 多聚 I 的三股鏈型氫鍵系統。三个次黃嘌呤碱基圍繞在以氫鍵相連的三重旋轉軸上
(A. Rich: *Biochim. biophys. Acta* 1958, **29**, 505 頁)

的离子强度将使其 ε(P) 值升高至腺嘌呤核苷酸的数值的 69%*，而 6.4 *M* 的尿素則使 ε(P) 增高更多，一直至这个数值的 87%。离子强度的改变和加入尿素对于多聚 U 的 ε(P) 值并无影响。多聚 C、多聚 G 和多聚 I 与它們相对应的单核苷酸相比时，亦表現出不正常的 ε(P) 的压低。这种增色效应(hyperchromic effects)是和以氫鍵連接的多聚 A 和多聚 I 螺旋結构中嘌呤基团間的相互作用使 ε(P) 值压低相一致，也和这种基团間的相互作用不能在单条鏈的自由卷曲結构的多聚 U 中发生的事实相一致。

多核苷酸間的相互作用

当研究多聚 AU 的性质并将其与多聚 A 和多聚 U 的混合物相比較而确定其是否为一眞正的聚合物时，Warner[41] 观察到在

* 原书为 61%，是錯誤的。根据文献(*Fed. Proc.* 1956, **15**, p. 379)，当离子强度增高至 0.2 时，消光系数〔ε(P)〕升高至腺嘌呤核苷酸的 69%(譯者注)

这两个聚合物之間发生了特殊的相互作用，以致这个混合物的 ε(P) 值是这两个聚合物的混合物的計算值的 68%，而且是其組成的单核苷酸 ε(P) 值的 55%。虽然 Rich[42] 指出多聚 A 和多聚 I 也能相互作用，而 Davies 和 Rich[43] 也指出多聚 I 和多聚 C 能形成一聚集体，但是沒有其他多核苷酸对呈現出这样显著的 ε(P) 值降低。这两个聚合物发生聚集作用是由电泳和沉降的研究得到証实的[44]。聚合物的电泳条件是这样安排的，以致多聚 A 和多聚 U 之間的迁移率存在着巨大的差别。在 pH 9.6，0°C 和离子强度为 0.1 时，多聚 A 的迁移率为 10.6×10^{-5} 厘米^2·伏特$^{-1}$·秒$^{-1}$ 而多聚 U 的迁移率则为 13.2×10^{-5}。如果不发生相互作用，則这个差别已足使这两个聚合物分开。但是，当这两个聚合物的混合物在相同的緩冲溶液中进行电泳时，則发現一个迁移率为 11.1×10^{-5} 的单峰。将这些聚合物的混合物进行沉降，也曾得到相同的結果。几个观察者所得的数值摘录在表 34 中。多核苷酸的混合物常沉降成为一个簡单的界区，其沉降系数远比这个混合物中的任何一个单独的多核苷酸为大。这在分子量已經测定的一个实例中已反映出这个聚集体的分子量比其組成核苷酸的分子量要大得多。

进一步支持这些聚合物間的特殊相互作用的証据是从 Ochoa[26] 的观察获得的，即当多核苷酸磷酸化酶对多聚 U 的磷酸解作用很快，而且差不多能在 1 小时內完成时，多聚(A+U)的磷酸解却十分緩慢而且不完全，在 5 小时后仅完成整个反应的 20%。这指出在复合物中多聚 U 的掺入会显著地影响其对酶作用的活力。同样值得注意的是，多聚 A 在溶液中的复合程度虽比多聚(A+U)为小，但也較在溶液中无氫鍵連接的自由卷曲的多聚 U的作用为慢。

这两个多核苷酸的相互作用还能使溶液的粘度显著增高[46]、整个吸收光譜改变以及上面所述的最大吸收降低[42](图 86)。从 Felsenfield、Davies 和 Rich[42,45,46] 以及 Warner[44] 对于多核苷酸在溶液中的特殊相互作用的研究結果，已經得到了这个反应的主要特征。Felsenfield 和 Rich[47,48] 曾制訂了一种测定形成的聚

表 34　核糖多核苷酸和混合的聚集体的沉降系数、扩散系数和分子量

核糖多核苷酸	濃　度 克分子濃度	pH	I	S_{20} S 单位	D_{20} 平方厘米/秒 $\times 10^7$	M	参考文献
多聚 A	—	7	—	2.5	—	8×10^4†	43
多聚 U	—	7	—	2.2	—	8×10^4†	
多聚(A+U)*	—	7	—	5.3	—	—	
多聚 A	0	—	—	5.3	1.7‡	1.77×10^5§	43
多聚 U	0	—	—	2.2	7.4‡	1.73×10^4§	
多聚 (A+U)	0	—	—	9.9	1.3‡	4.5×10^5§	
多聚 A	—	—	—	8.0	—	—	44
多聚 U	—	—	—	3.2	—	—	
多聚 (A+U) (1:1)	—	—	—	12.6	—	—	
多聚 (A+U) (1:2)	—	—	—	17.3	—	—	
多聚 A	6×10^{-5}	6.8	0.05	7.2	—	—	41
多聚 I	6×10^{-5}	6.8	0.05	6.8	—	—	
多聚 (A+I) (1:1)	6×10^{-5}	6.8	0.05	10.4	—	—	
多聚 (A+I) (1:2)	6×10^{-5}	6.8	0.05	14.7	—	—	
多聚 I	—	6.7	0.1	7.4	—	—	42
多聚 C	—	6.7	0.1	5.5	—	—	
多聚 (I+C)	—	6.7	0.1	13.9	—	—	

* 混合的聚集体簡略为多聚(A+U)等；不应与多聚 AU 等混淆，后者所指的是互聚体

† 由端基分析所測得的

‡ 濃度为 0.2% 的

§ 偏微比容(Partial specific volume)为 0.58

集体中各个多核苷酸克分子比的簡便方法。这个方法利用了混合物的光密度随着組成的不同而发生的变化。如果多聚 A 和多聚 U 的濃度之和保持不变，并在不同的克分子比下測定其光密度，则很容易得到两条直綫，此两条直綫相交于这个复合物的克分子比处。图 87 解釋了这个方法，图中說明多聚 A 和多聚 U 混合物在 0.1M 氯化鈉溶液中在 259 mμ 处的光密度是克分子分数的函数。图中很清楚地表示出形成一个 1:1 的复合物。复合物的形成和形成的速率絕大部分决定于离子强度以及所存在的离子的本质。在蒸餾

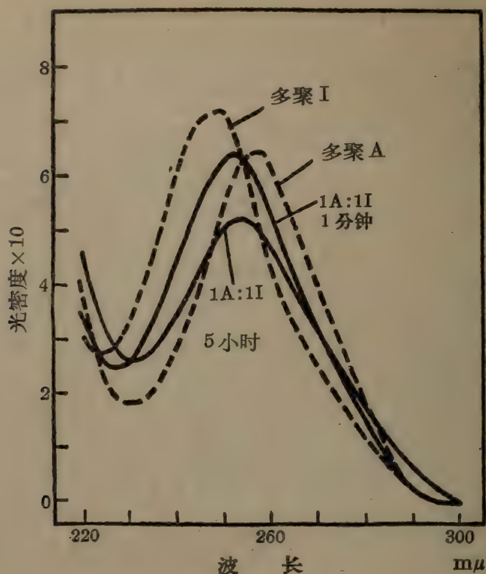


图 86 由二个不同多核苷酸間相互作用所产生的多核苷酸吸收光譜的变化
(A. Rich: *Nature, Lond.* 1958, **181**, 522 頁)

水中沒有复合物形成[44,47]，这可以从完全沒有增色效应的事实看到。但是，离子的加入会使光密度降低并生成复合物，象图 88 所表示的。这个行为是可逆的[47]，而且如果考虑到除去离子会使光密度增高，則这个行为和脫氧戊糖核酸在稀釋电解质溶液时所发生的变性有相似之处，它們的主要差别就是后者的过程是不可逆的（参看第十一章，246 頁）。

在 $10^{-2}M$ 鎂离子或其他二价阳离子的存在下，或在高濃度氯化鈉溶液中（$0.7M$），Felsenfield、Davies 和 Rich[45,47] 发現混合物的曲綫具有新的形状（图 89），其最低值出現在多聚 U* 与多聚 A* 的克分子比为 2:1 处。Rich[42] 曾观察到多聚 I 与多聚 A 所形成的复合物也有相似的性质，虽然在这个情况下 2:1 复合物的形成更为容易。在 $0.05M$ 氯化鈉溶液中，混合多聚 I 和多聚 A 可立即得

* 原文尿嘧啶核苷应为多聚 U，腺嘌呤应为多聚 A（譯者注）

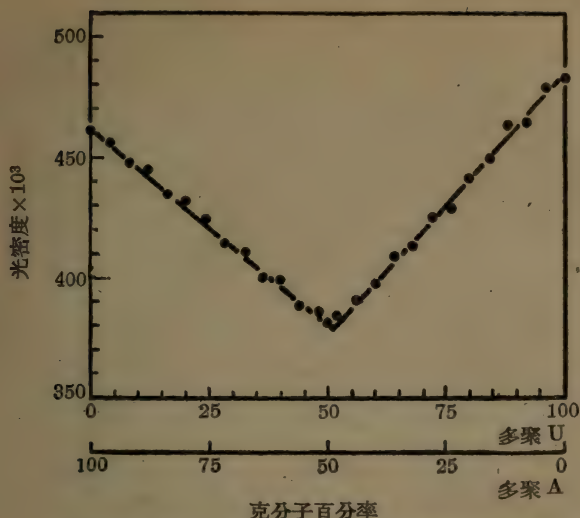


图 87 在 259 mμ 处多聚 A 和多聚 U 混合物的光密度变化与其組成的关系

光密度是在混合后 15 分钟內測定的。所有溶液都在 pH 7.4 的 0.1*M* 氯化鈉，0.01*M* 甘氨酰甘氨酸中。

(G. Felsenfield 和 A. Rich: *Biochim. biophys. Acta,* 1957, **26**, 461 頁)

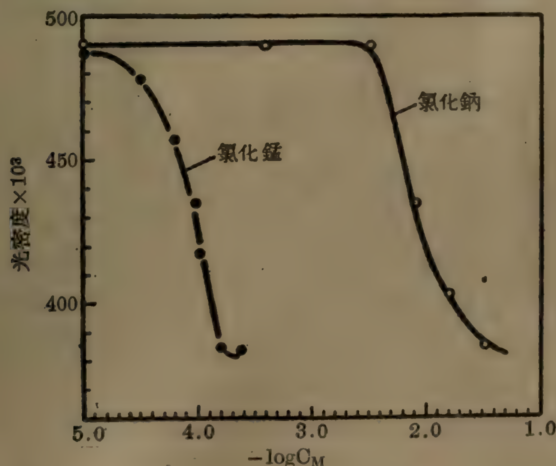


图 88 在蒸餾水中加入金属离子对 A:U(1:1)混合物光密度的影响，以光密度对总濃度作的曲綫

(G. Felsenfield 和 A. Rich: *Biochim. biophys. Acta,* 1957, **26**, 462 頁)

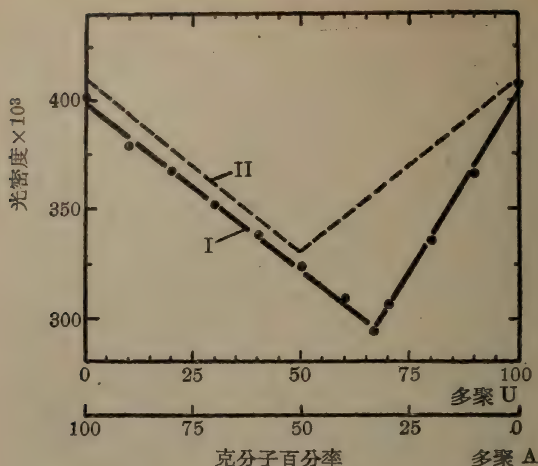


图 89 不同量的多聚 A 和多聚 U 的混合物的光密度

I. 溶液含有 0.1*M* 氯化鈉, 0.01*M* 甘氨酰甘氨酸 (pH 7.4) 和 $1.2\times10^{-2}M$ 氯化鎂; II. 在加氯化鎂以前的光密度

(G. Felsenfield 和 A. Rich: *Biochim. biophys. Acta* 1957, **26**, 462 頁)

到 1:1 的复合物,但光密度随着时間而改变。混合 5 小时后 2:1 复合物的形成即达到完全。鉴于这与周圍的离子环境有关,看来复合物的形成决定于参加的多核苷酸的实际离子的状态的成分是非常的大。若将混合的多核苷酸溶液加热,則在某一温度时出現光密度的明显升高[44],这一温度就是每一种混合的聚合物的特性[36](图 83)。因此以氫鍵連接的复合物可解离(变性)成为单独的多核苷酸,这个多核苷酸具有一个缠繞的自由卷曲构型。这个过程是可逆的,因为在冷却时光密度重新降低。这一过程也和脫氧戊糖核酸的热变性相似。它們只有一个重要的区别,即后者是不可逆的。轉变发生的温度表示出复合物的稳定性是按照多聚(A+2I)、多聚(C+I)和多聚(A+U)的次序而增加的。

从濃的、粘稠的复合物溶液中能抽出强韌如玻璃的纤維。这些纤維无双折射[46]。已經得到了这些纤維的清楚的 X-射綫衍射图象。从多聚(A+U)的图象可以看出它的分子是一条双股螺旋[46],其中一股为多聚 A 的核鏈,另一股为多聚 U 的核鏈。腺嘌

哈和尿嘧啶間存在着氫鍵，与所推測的脫氧戊糖核酸中腺嘌哈和胸腺嘧啶間存在着氫鍵相似(参看第九章，162頁)，其中一个碱基对堆迭在另一个上面，并且几乎与纤維軸相垂直。如果从螺旋軸看去，这两个糖-磷酸骨架較諸脫氧戊糖核酸分子中的糖-磷酸骨架有較小角度的分离。对这个現象的最簡单解釋是假定这种骨架鏈具有一个平行的排列定向以代替在脫氧戊糖核酸中所假定的反平行排列定向(参看第九章，161頁)。Rich[42]从多聚(A+I)纤維所得到的X-射綫衍射图象的了解，对这个多聚体的結构提出了一种相似的結构。图90表示出連接两个缠繞的螺旋鏈的次黄嘌哈和腺嘌哈間的氫鍵。腺嘌哈的氨基是和次黄嘌哈的羰基的氧相連，而两个嘌哈的氮原子都連接在一个氫鍵上。以氫鍵連接而重迭的嘌哈碱之間的距离为3.4Å。

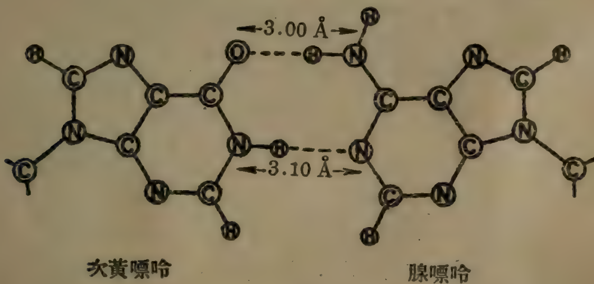


图90 多聚(A+I)中的次黄嘌哈与腺嘌哈間的氫鍵
(A. Rich: *Nature, Lond.* 1958, **181**, 524頁)

对复合物多聚(A+2U)和多聚(A+2I)至今还沒有进行过X-射綫的研究。但是，在这两个例子中，Rich[42]与Felsenfield、Davies和Rich[45]根据分光光度和沉降測定的数据认为这些复合物必定是具有三股鏈形式的結构。在多聚(A+U)和多聚(A+I)的二股鏈模型基础上，一般认为多聚U和多聚I的第三股鏈分别位于其两股鏈分子的螺旋凹槽部分。例如在多聚(A+2I)中，Rich[42]认为第二个次黄嘌哈碱是由两个氫鍵与腺嘌哈殘基相連的，即次黄嘌哈的羰基氧原子和$N_{(1)}$是分别与腺嘌哈的氨基氮原

子和$N_{(7)}$連接。对于多聚(A+2U),亦认为有相似的排列[45]。根据镁离子可被螯合成为复合物的一部分并可能占据上面所提的涉及氫鍵的某些位置,Zubay[49]曾对这种結构提出了异义。如果提出的根据是可靠的話,在上述那些位置上的氫鍵就不可能形成。因此Zubay[49]对多聚(A+2U)提出了另一个三股鏈的結构(图91)。和Rich 所假定的第三股鏈占据在双螺旋的凹槽部分的模型不同,这个結构包含三股互相缠繞成的多核苷酸鏈,它們在螺旋中占有同等的位置。这意味着在多聚(A+U)+U⟶多聚(A+2U)的反应中,第一复合物一定发生了分子重排列。多聚(A+2U)的初步衍射图象一般是用来証明具有这种結构的主要特征[49]。

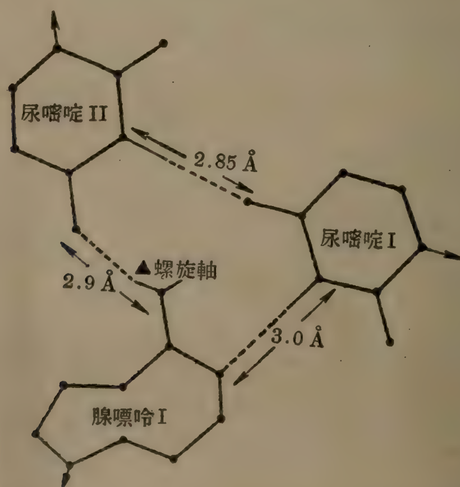
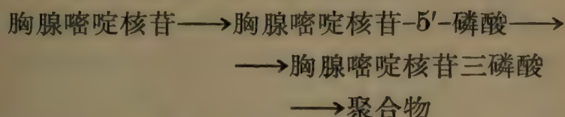


图 91 在多聚(A+2U)中的两个尿嘧啶和一个腺嘌呤殘基間的氫鍵
腺嘌呤 I 的平面对尿嘧啶 I 約傾斜 44°;对尿嘧啶 II 傾斜約 37°
(G. Zubay: *Nature, Lond.* 1958, **181**, 389 頁)

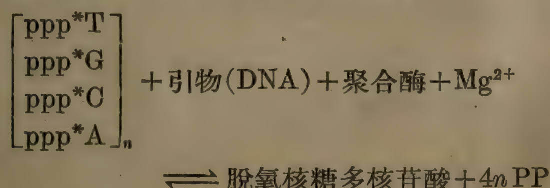
合成的脫氧核糖多核苷酸

随着 Kornberg、Lehman 和 Simms[50] 发現胸腺嘧啶核苷(在 $C'_{(2)}$ 位置上用 C^{14} 标記)可以被从正常的大腸杆菌分离出来的

酶轉变为脱氧核糖多核苷酸之后，Kornberg 及其同工者发展了高分子量脱氧核糖多核苷酸合成的工作。脱氧核糖多核苷酸中胸腺嘧啶核苷掺入的反应次序为：


胸腺嘧啶核苷⟶胸腺嘧啶核苷-5′-磷酸⟶
⟶胸腺嘧啶核苷三磷酸
⟶聚合物

在聚合作用发生前，胸腺嘧啶核苷首先轉变为-5′-三磷酸的发現使 Kornberg、Lehman、Bessman 和 Simms[51~53] 在制备聚合物时采用了由酶作用制成的各种脱氧核糖核苷酸的5′-三磷酸(用 P^{32} 标記第一磷酸基)。为了使合成反应能够发生，必須有鎂离子和一个具有脱氧核糖核酸形式的引物存在。由称为‘聚合酶’[54] 的酶所引起的聚合作用仅发生于所有四种脱氧核糖核苷三磷酸都存在的情况下。底物缺少它們中的任何一个时将降低聚合的速率至完整体系的0.5%左右[52,55]。这个反应是可逆的，而且焦磷酸是随着脱氧核糖多核苷酸而产生的。脱氧核糖多核苷酸含有所有放射性的磷。这个反应可用反应式表示如下*：


$$\begin{bmatrix} ppp^*T \\ ppp^*G \\ ppp^*C \\ ppp^*A \end{bmatrix}_n + \text{引物(DNA)} + \text{聚合酶} + Mg^{2+}$$
$$\rightleftharpoons \text{脱氧核糖多核苷酸} + 4n\,PP$$

将聚合酶尽量純化[54] 仍不能得到完全不含有脱氧核糖核酸酶的聚合酶。因此，这样制得的聚合物就不可能具有最大的分子量。

若使要合成足够量的脱氧核糖核酸就需要所有四个脱氧核糖核苷三磷酸和脱氧核糖核酸以及酶的存在。这个事实指出加入的核酸是作为引物和模板[55] 之用，并且要使脱氧核糖多核苷酸有足够分量的合成，只有当所有作为互补的脱氧核糖核苷可以用来进行聚合作用时才有可能。用核糖核苷-5′-三磷酸代替脱氧核糖核苷-5′-三磷酸会阻止聚合作用。例如，在底物中用腺嘌呤核苷三

* 字母 T、G、C 和 A 是指脱氧核糖核苷；DNA＝脱氧核糖核酸

磷酸代替脱氧腺嘌呤核苷-5′-三磷酸就阻止了聚合物的形成[55]。但是，用脱氧尿嘧啶核苷-5′-磷酸代替胸腺嘧啶核苷-5′-磷酸，使尿嘧啶取代胸腺嘧啶并不抑制这个反应[56]，而尿嘧啶却代替了胸腺嘧啶掺入脱氧核糖多核苷酸中。也曾发現5-溴尿嘧啶同样可以代替胸腺嘧啶，5-甲基和5-溴胞嘧啶可以代替胞嘧啶以及次黄嘌呤可以代替鳥嘌呤，但鳥嘌呤不能被黄嘌呤所代替。虽然次黄嘌呤在2位上不象鳥嘌呤中在2位上有一个氨基，但承担着形成鳥嘌呤与胞嘧啶間的氫鍵的其他两个取代基仍然存在。曾經看到的脱氧次黄嘌呤核苷三磷酸的掺入速率低于脱氧鳥嘌呤核苷三磷酸的掺入速率可能是因为在鳥嘌呤的氨基和胞嘧啶的羰基間并沒有第三个氫鍵存在。脱氧黄嘌呤核苷三磷酸不掺入脱氧多核苷酸，現在看来尚沒有解釋[57]。

作为酶的引物的脱氧戊糖核酸的形式是重要的，因为用酸或脱氧核糖核酸酶处理过的核酸不能促进这个反应。但是天然未变性的和取自几种来源并小心使其变性的脱氧戊糖核酸則可以加以应用。已經証明：合成的脱氧多核苷酸經酶促水解后具有核酸的典型的3′，5′-磷酸二酯鍵[55]。

Adler、Lehman、Bessman、Simms和Kornberg[58]曾研究过合成作用的第一阶段，即将单独一种脱氧核苷酸加到作为引物的脱氧戊糖核酸中，亦即仅用四个可能的脱氧核苷三磷酸(用C^{14}或P^{32}标記)中的一个与脱氧戊糖核酸作用。为了增加产量，曾将脱氧戊糖核酸的濃度增加到一般用于引起反应的濃度的二十五倍。虽然由于脱氧核糖核酸的多分散性以及缺乏有关可以作为引物的样品中的脱氧核糖核酸分子大小和数目的知識，这个反应还不能知道得很清楚，但是实驗的結果指出，当平均地作估計时，每个单独的脱氧戊糖核酸分子能与一分子的脱氧核糖核苷酸加合。这个反应不能继續不断地进行，因为缺乏合成脱氧多核苷酸所需的其他三个脱氧核糖核苷三磷酸。并且根据酶消化产物的分析結果，亦曾証实单独一种脱氧核苷三磷酸是与脱氧核糖核酸分子末端的脱氧核苷形成一个3′，5′-磷酸二酯鍵。

鉴于酶能促进一个脫氧核苷酸加在引物脫氧戊糖核酸分子末端的事实，并且基于在这个特殊氫鍵連接的結构中所存在的碱基对，可以推測在这个合成的脫氧多核苷酸中：(1)腺嘌呤对胸腺嘧啶和鳥嘌呤对胞嘧啶之比都为1，和(2)碱基分析的結果与引物碱基分析的結果都相同。Lehman、Zimmerman、Adler、Bessman、Simms 和 Kornberg[59]証明这些推測是正确的，象在表35中所示的。因此这似乎是，引物脫氧戊糖核酸是供作模板之用，而所产生的脫氧多核苷酸是一个眞正的核酸，并且在各方面都与天然制品相同。对这种复制假說的严格考驗是某些脫氧戊糖核酸重新具有遺傳轉移的活力。不幸得很，到目前为止，从实驗的結果还不能遽下結論[59]，这很可能是由于在酶制剂中倘有脫氧核糖核酸酶的活力，以致使产物发生某些降解。

虽然一般都只有在所有四种脫氧核苷三磷酸和引物脫氧核糖

表35 酶合成的脫氧核糖多核苷酸中的嘌呤碱和嘧啶碱的組成

脫氧戊糖核酸引物的来源	A	T	G	C	$\frac{A+T}{G+C}$	$\frac{A+G}{T+C}$
M. phlei						
引物	0.65	0.66	1.35	1.34	0.49	1.01
产物	0.66	0.80	1.17	1.34	0.59	0.85
A. aerogenes						
引物	0.90	0.90	1.10	1.10	0.82	1.00
产物	1.02	1.00	0.97	1.01	1.03	0.99
大腸杆菌						
引物	1.00	0.97	0.98	1.05	0.97	0.98
产物	1.04	1.00	0.97	0.98	1.02	1.01
小牛胸腺						
引物	1.14	1.05	0.90	0.85	1.25	1.05
产物	1.19	1.19	0.81	0.83	1.46	0.99
T2 噬菌体						
引物	1.31	1.32	0.67	0.70	1.92	0.98
产物	1.33	1.29	0.69	0.70	1.90	1.02

(摘自 I. R. Lehman, S. B. Zimmerman, J. Alder, M. J. Bessman, E. S. Simms 和 A. Kornberg: *Proc. nat. Acad. Sci. Wash.* 1958, **44**, 1193 頁)

核酸的存在下才能形成脫氧多核苷酸，但在沒有加入的脫氧核糖核酸的情况下，經过 3～6 小时的潜伏期后，一个脫氧腺嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸的互聚体亦能借聚合酶而形成。这个互聚体引起合成新的聚合物时沒有任何潜伏期。虽然在底物中存在着四种脫氧核苷三磷酸，可是合成的新的聚合物只含脫氧腺嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸。这个合成的結果进一步証明了酶合成作用中的复制功能。到目前为止仅含脫氧鳥嘌呤核苷酸和脫氧胞嘧啶核苷酸的聚合物还沒有制得。

关于脫氧多核苷酸的物理化学的研究至今还做得很少。利用超离心分析[60] 曾显示出这类物质是多分散性的，并且如与用作引物的脫氧核糖核酸沉降系数 25 S 相比时，其不同制品的沉降系数范圍是 20S 至 30S。合成聚合物的特性粘数是在 $1.5 \sim 3.0 \times 10^3$ c.g.s. 单位之間，而小牛胸腺脫氧核糖核酸的特性粘数是 5.0×10^3 c.g.s. 单位。从这些数据得到的合成的脫氧核糖多核苷酸的分子量約为 5×10^6。在 100°C 使其发生热变性会使特性粘数显著下降至 0.1×10^3 c.g.s. 单位，虽然沉降系数只降至 14S。这是与天然脫氧核糖核酸的性质相一致的。从初步的研究，有各种迹象表明，合成的聚合物在溶液中最好是用硬的卷曲的模型来表示。象已在第十一章中描述(266 頁)的，只含脫氧腺嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸的互聚体在 69°C 时就会发生变性，这与天然脫氧核糖核酸的变性温度随着組成而变化的現象相一致[61]。

(陶鴻根 譯)

参考文献

[1] Grunberg-Manago, M. and Ochoa, S. *Fed. Proc.* 1955, **14**, p. 221

[2] Grunberg-Manago, M. and Ochoa, S. *J. Amer. chem. Soc.* 1955, **77**, p. 3165

[3] Grunberg-Manago, M., Ortiz, P. J. and Ochoa, S. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **20**, p. 269

[4] Ochoa, S. and Heppel, L. A. *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D.

McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 615
[5] Ochoa, S. *Fed. Proc.* 1956, **15**, p. 832
[6] Beers, R. F. *Fed. Proc.* 1956, **15**, p. 13
[7] Beers, R. F. *Biochem. J.* 1957, **66**, p. 686
[8] Beers, R. F. *Nature, Lond.* 1956, **178**, p. 595
[9] Beers, R. F. *Science* 1955, **122**, p. 1016
[10] Beers, R. F. *Nature, Lond.* 1956, **177**, p. 790
[11] Olmsted, P. S. *Fed. Proc.* 1957, **16**, p. 229
[12] Littauer, U. Z. *Fed. Proc.* 1956, **15**, p. 302
[13] Littauer, U. Z. and Kornberg, A. *J. biol. Chem.* 1957, **226**, p. 1077
[14] Brummond, D. O., Staehelin, M. and Ochoa, S. *J. biol. Chem.* 1957, **225**, p. 835
[15] Beers, R. F. *Nature, Lond.* 1957, **180**, p. 246
[16] Beers, R. F. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958, **75**, p. 497
[17] Mii, S. and Ochoa, S. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **26**, p. 445
[18] Heppel, L. A. and Rabinowitz, J. C. *Annu. Rev. Biochem.* 1958, **27**, p.613
[19] Singer, M. F., Heppel, L. A. and Hilmoe, R. J. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **26**, p. 447
[20] Steiner, R. F. and Beers, R. F. *J. Polym. Sci.* 1958, **30**, p. 17
[21] Fresco, J. R. and Doty, P. *J. Amer. chem. Soc.* 1957, **79**, p. 3928
[22] Grunberg-Manago, M., Ortiz, P. J. and Ochoa, S. *Science* 1955, **122**, p.907
[23] Heppel, L. A., Smith, J. D., Ortiz, P. J. and Ochoa, S. *Fed. Proc.* 1956, **15**, p. 273
[24] Smellie, R. M. S. (quoted in refs. 4 and 5)
[25] Singer, M. F. *Fed. Proc.* 1957, **16**, p. 250
[26] Ochoa, S. *Arch. Biochem. Biophys.* 1957, **69**, p. 119
[27] Warner, R. C. (quoted in ref. 4)
[28] Doty, P. (quoted in ref. 4)
[29] Warner, R. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1957, **69**, p. 314 (see also ref. 4)
[30] Cavalieri, L. F. and Rosoff, M. (quoted in ref. 4)
[31] Steiner, R. F. and Beers, R. F. *Biochim. biophys. Acta*—in press
[32] Steiner, R. F. and Beers, R. F. *J. Polym. Sci.* 1958, **31**, p. 53
[33] Smith, J. D. (quoted in ref. 5)
[34] Beers, R. F. and Steiner, R. F. *Nature, Lond.* 1957, **179**, p. 1076
[35] Rich, A. *Biochim. biophys. Acta* 1958, **29**, p. 502
[36] Doty, P., Boedtker, H., Fresco, J. R., Haselkorn, R. and Litt, M. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1959, **45**, p. 482
[37] Rich, A. *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Balitmore, 1957, p. 557

[38] Watson, J. D. *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 552
[39] Rich, A. Special Publication N. Y. Acad. Sci. 1957, **5**, p. 186
[40] Broomhead, J. *Acta Cryst*. 1949, **2**, p. 64
[41] Warner, R. C. *Fed. Proc*. 1956, **15**, p. 379
[42] Rich, A. *Nature, Lond*. 1958, **181**, p. 521
[43] Davies, D. R. and Rich, A. *J. Amer. chem. Soc*. 1958, **80**, p. 1003
[44] Warner, R. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1957, **69**, p. 314
[45] Felsenfield, G., Davies, D. R. and Rich, A. *J. Amer. chem. Soc*. 1957, **79**, p. 2023
[46] Rich, A. and Davies, D. R. *J. Amer. chem. Soc*. 1956, **78**, p. 3548
[47] Felsenfield, G. and Rich, A. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **26**, p. 457
[48] Felsenfield, G. *Biochim. biophys. Acta* 1958, **29**, p. 133
[49] Zubay, G. *Nature, Lond*. 1958, **182**, p. 388
[50] Kornberg, A., Lehman, I. R. and Simms, E. S. *Fed. Proc*. 1956, **15**, p. 291
[51] Kornberg, A., Lehman, I. R., Bessman, M. J. and Simms, E. S. *Biochim. biophys. Acta* 1956, **21**, p. 197
[52] Bessman, M. J., Lehman, I. R., Simms, E. S. and Kornberg, A. *Fed. Proc*. 1957, **16**, p. 153
[53] Kornberg, A. *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 579
[54] Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S. and Kornberg, A. *J. biol. Chem*. 1958, **233**, p. 163
[55] Bessman, M. J., Lehman, I. R., Simms, E. S. and Kornberg, A. *J. biol. Chem*. 1958, **233**, p. 171
[56] Bessman, M. J., Lehman, I. R., Adler, J., Zimmerman, S. B., Simms, E. S. and Kornberg, A. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash*. 1958, **44**, p. 633
[57] Pauling, L. and Corey, R. B. *Arch. Biochem. Biophys*. 1956, **65**, p. 164
[58] Adler, J., Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S. and Kornberg, A. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash*. 1958, **44**, p. 641
[59] Lehman, I. R., Zimmerman, S. B., Adler, J., Bessman, M. J., Simms, E. S. and Kornberg, A. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash*. 1958, **44**, p. 1191
[60] Schachman, H. K., Lehman, I. R., Bessman, M. J., Adler, J., Simms, E. S. and Kornberg, A. *Fed. Proc*. 1958, **17**, p. 304
[61] Marmur, J. and Doty, P. *Nature, Lond*. 1959, **183**, p. 1427

第十五章　核酸的螺旋結构和复制

从前面几章所提及的核酸結构的証据似乎已能肯定戊糖核酸和脱氧戊糖核酸这二类物质都具有卷曲的、并由氫鍵稳定的螺旋結构。合成的多核苷酸和多肽在适宜的离子条件的溶液中也可以具有螺旋結构等观察，引起了这样一个問題，即由这种氫鍵連接的螺旋結构是否就是在細胞或病毒中所存在的眞实結构，因为这也是可以想象的事，即这样的結构可能就是在提取过程中形成的一种矯作物。关于这种看法的直接証明，需要在体外对核酸进行很多、可能是很困难的研究。要研究天然环境中的大分子結构，不但需要克服許多技术上的困难，而且因为在細胞中核酸不会单独存在(除非核酸与蛋白质結合在一起)，还需要知道要比目前知道得更多的关于核蛋白結构的知識。

Wilkins[1] 曾对已經固定的和未經固定的細胞和細胞核进行过 X-射綫衍射研究。当活細胞受 X-射綫照射时，立即就会死掉；但是 Wilkins 认为，若将流动的一群細胞通过衍射照相机，使每个活細胞只接受比致死量少的剂量，則有可能得到活細胞中核蛋白的 X-射綫衍射照片。虽然这样的研究尚待进行，但已經得到了一个在完整无損的生精細胞中并在开始曝露于 X-射綫时是活的、未經固定的 *Loligo* 精子的 X-射綫照片。这样得到的衍射图象与用从色素取得的并用水洗滌后加以干燥、然后再加以湿潤的精子的衍射图象非常相似。并且这个衍射图象和純化后的脱氧戊糖核酸的图象特別相象。这个重要的实驗直接証明了脱氧戊糖核酸的結构在提取、純化和干燥过程中似乎很少发生变化或者沒有发生比較大的变化。另外，某些脱氧戊糖核酸的遺傳轉移活力和病毒核酸的感染力提供了有力的和現实的証据。这些具有生物活力的核酸必定具有眞正的天然构型，并且看来还具有和其他核酸相同的性

质和結构。脱氧戊糖核酸变性的不可逆性証明了以氫鍵連接的特殊結构在引起多核苷酸聚集的条件下是不能形成的。因此在提取过程中，这样的結构也未必就能形成。

上述的証据支持了这样的見解：以氫鍵連接的螺旋結构不是一种矯作物，而是代表細胞中眞正的結构。然而尙有相反的証据，卽当烟草花叶病毒的核糖核酸的結构被认为是单股螺旋时，則根据現代X-衍射照片的判断，提取出的核糖核酸应該是一个双股螺旋(参看第十二章)。但是，认为在提取过程中可能发生聚集作用的这个証据，只能应用于目前我們对核酸結构尙不能比脱氧戊糖核酸結构更肯定的那些核酸。因此，虽然在提取核酸时(应用温和的方法)不能完全忽視聚集作用或其他結构变化的可能性，但对所有核酸未必尽然，特别是对于脱氧戊糖核酸更不是如此。

合成的多核苷酸在溶液中生成由氫鍵連接的螺旋結构的研究表明，形成的螺旋結构的稳定性是依賴于氫鍵的特异性的。因此核酸的稳定性似乎遵循这样的順序：多聚A、多聚(A+U)、多聚AGUC、核糖核酸。在这个次序中的最后两个多聚体的稳定性似乎是可以比拟的。因此稳定性是随着复杂程度而增加，而复杂程度又会对氫鍵的特异性产生影响。在多聚A中大概不是全部的腺嘌呤殘基都参加氫鍵的生成的，所参加的腺嘌呤殘基只是足以使螺旋体中的双股鏈保持着象一个单独的流体动力单位(hydrodynamic unit)。这样的連接不但是相当的微弱，而且是可逆的，犹如变性的脱氧戊糖核酸所发生的情况一样。脱氧戊糖核酸的变性使特异的氫鍵断裂，形成了单鏈結构(unique structure)，并且这种过程是不可逆的。但是一些可逆而微弱的氫鍵仍然存在于这种变性的单位中。虽然我們已經有了有力的証据可以証明多聚A会聚集成比較剛硬的单位，并且在聚集体中还是可以形成螺旋区域，但是对于形成完全螺旋的构型，仍然是推測的。

以氫鍵連接的核酸結构的稳定性的改变，正象热变性时的温度所显示的那样(参看第十一章)，可以在核酸間的可能差异(就是产生不同遺傳行为的原因)表上增添一个附加的参数。已經指出，

核酸的差异可以由組成成分、核苷酸排列次序和分子量的不同而产生，而現在我們在这些因素中可以增加另一个因素，即稳定性。这个因素并不是完全独立的可变因素，因为它与所有的其他因素有关，并且也决定于所有的其他因素。但是，鉴于所推测的复制机制，其中核酸双股鏈的分开是一个必要的步驟(参看下面)，复制过程中所需的能量将部分地取决于螺旋結构的稳定性。

核酸的复制机制曾經是許多討論和推測的主題[2]。如果已經完全确証了在溶液中合成的多核苷酸，不論是相同的或者是不相同的，都形成双股螺旋体，或者仅形成双股螺旋区，則这些反应的全面研究对我們了解核酸复制机制是重要的。所有对天然核酸和合成的多核苷酸的証据都指出这二条股鏈是沿着一条共同的軸而互相纏繞的，也就是說这个螺旋体是由复合型的(plectonemic)卷曲而不是由平行型的(paranemic)卷曲形成。因此，如果双螺旋中的每条鏈都作为形成另一条鏈的模板，則复制机制，象 Watson 和 Crick[3] 原先所考虑到的，必須包括螺旋的解开。这就是說，当解开螺旋的每一个圈时，整个双螺旋必須环繞着軸旋轉一周。Levinthal 和 Crane[4] 曾計算出螺旋解开所需的能量，并发現其仅为 150 卡/克分子，相当于解开复制鏈环的能量。这一数值，当与形成多核苷酸鏈的磷酸二酯鍵所需的能量相比时，显得小些。脫氧戊糖核酸分子的眞实形状因此不会是直的，而应該是弯的、折叠的或卷曲的。但是 Levinthal 和 Crane 认为它应該象速度計的纜索(speedometer cable)那样旋轉的，而沒有任何离軸的运动。人們常假定复制进行与螺旋拆开同时发生，因此在任何一瞬間都有象图 92 那样的 Y 形构型，Y-型的三条支鏈都向着同一方向旋轉。也有人提出过更复杂的拆开方式，但拆开的能量与原来所建議的复制机制所需要的能量并沒有多大区别。

其他所提出的很不相同的复制机制包括用酶对双螺旋中的一个多核苷酸鏈进行消化，而保留另一条鏈作为模板，以及由一系列的多核苷酸鏈的折断和再結合使两条互补的鏈分开。Delbrück[5] 认为这些鏈的折断和再結合是与复制同时发生的，而折断是在两

条鏈上同时进行的。因此在每条鏈的每半圈螺旋上将发生一个折断，即在每5个单核苷酸单位处有一个折断。这些进行复制的方法似乎排除困难少，引起困难反而更多。最近的研究工作（例如Meselson 和 Stahl[6] 的研究）表明当脫氧戊糖核酸一代一代地复制下去时，在母代的脫氧戊糖核酸分子中原来的多核苷酸单鏈仍然保留着。因此，对所提出的包括酶对原来两条鏈中之一进行消化的机制似乎不能成立。虽然沒有武断的根据[2]认为这些复制机制中的一个比其他一个更为可取，但与形成磷酸二酯鍵所需的能量作比較时，旋轉每个圈所需的低能量似乎使人們对拆开的复制机制更为欢迎。因此目前似乎有理由可以假定遺傳信息从母代的脫氧戊糖核酸轉移給新一代的脫氧戊糖核酸，并轉移給其他特殊的結构（如蛋白质和戊糖核酸），在整个合成过程中的某些步驟上都牵連到一个拆开的程序[7]。

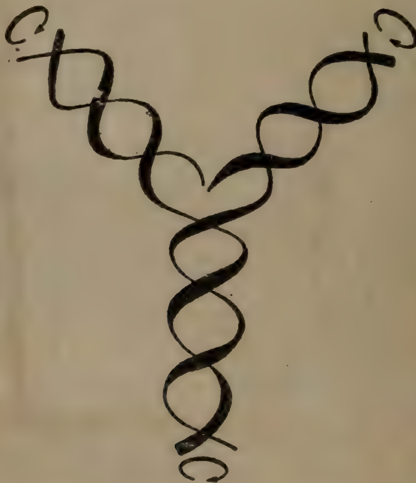


图 92 Watson 和 Crick 所設計的脫氧戊糖核酸的拆开和复制
Y-型的三条支鏈的旋轉方向如图所示
〔M. Delbrück 和 G. S. Stent: *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElory 和 B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, 704 頁〕

Ochoa 以及 Kornberg 对能够合成核酸的酶的分离工作开辟了深入研究复制机制的可能性。Kornberg 及其同工者(参看第十四章)已經指出，通过酶的作用，一个单独的脱氧核苷三磷酸与脱氧核糖核酸引物的反应发生在核酸分子的脱氧核苷一端。这样的一个脱氧核苷酸的添加很可能是母体引物脱氧戊糖核酸的酶复制机制的第一步。在决定下一步的添加是否为特殊的、互补的脱氧核苷酸时所引起的主要困难之一是作为引物的脱氧戊糖核酸的不均一性。但是現在看来，这个可能性在脱氧戊糖核酸的逐步合成过程中是存在的。

(潘筱平 譯)

参考文献

[1] Wilkins, M. H. F. Special Publication N. Y. Acad. Sci. 1957, **15**, p. 180

[2] Delbrück, M. and Stent, G. S. *The Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 699

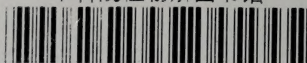
[3] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1953, **18**, p. 123

[4] Levinthal, C. and Crane, H. R. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1956, **42**, p. 436

[5] Delbrück, M. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1954, **40**, p. 783

[6] Meselson, M. and Stahl, F. W. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1958, **44**, p. 671

[7] Williams, R. C. *Rev. mod. Phys.* 1959, **31**, p. 233


中科院植物所图书馆
S0017381

注　　意

1　借書到期請即送还。
2　請勿在書上批改圈点，折角。
3　借去图書如有污损遺失等情形须照价賠偿。

統一书号 13119·621
定　价 1.70元